

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
des Doktors der Naturwissenschaften
(Doctor rerum naturalium)



eingereicht an der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

SYNAPTISCHE PATHOLOGIE IN TAU-TRANSGENEN MAUSMODELLEN

NEURODEGENERATIVER ERKRANKUNGEN:

EINE INTRAVITALMIKROSKOPISCHE STUDIE

vorgelegt von

Nadine Ariane Hoffmann

aus Darmstadt

2013

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

Erklärung

Diese Dissertation wurde von Herrn Prof. Dr. Jochen Herms am Lehrstuhl für Translationale Hirnforschung der Ludwig-Maximilians-Universität betreut und von Frau Prof. Dr. Dr. Elisabeth Weiß an der Fakultät für Biologie vertreten. Hiermit erkläre ich, dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist und dass ich mich anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg nicht unterzogen habe.

München, den 11. Juli 2013

Erstgutachterin:	Frau Prof. Dr. Dr. Elisabeth Weiß
Zweitgutachter:	Herr Prof. Dr. Rainer Uhl
Dissertation eingereicht am:	11. Juli 2013
Tag der mündlichen Prüfung:	13. Mai 2014

Für meine Eltern und meinen Sohn Niklas Jonathan

Ein Schritt vom Wege
Zwei Schritte vom Wege
Drei Schritte vom Wege
Wo ist der Weg?

Vier Schritte vom Wege
Fünf Schritte vom Wege
Sechs Schritte vom Wege
Da ist kein Weg!

Sieben Schritte vom Wege
Acht Schritte vom Wege
Neun Schritte vom Wege
Ist da ein Weg?

Zehn Schritte vom Wege
Elf Schritte vom Wege
Zwölf Schritte vom Wege
Das ist der Weg!

(Robert Gernhardt, 1997)

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	1
SUMMARY	3
1. EINLEITUNG	5
1.1 Neurodegenerative Erkrankungen	5
1.2 Tauopathien	6
1.2.1 (Patho-) Physiologie des Tau-Proteins	6
1.2.2 FTDP-17: <i>MAPT</i> -Mutationen als Ursache Frontotemporaler Demenz	9
1.2.3 Alzheimer-Demenz	10
1.3 Neurodegeneration und Inflammation	15
1.4 Demenzforschung anhand transgener Mausmodelle	17
1.5 Synapsen: Verbindungselemente und Gedächtniskorrelat	20
1.5.1 Dendritische Spines: exzitatorische postsynaptische Spezialisierungen	20
1.5.2 Strukturelle Plastizität dendritischer Spines	22
1.6 Hochauflösende Mikroskopietechniken	24
1.7 Zielsetzung	27
2. MATERIAL UND METHODEN	29
2.1 Transgene Mauslinien	29
2.1.1 Tau P301S	29
2.1.2 APP PS1	30
2.1.3 3xTg-AD	31
2.1.4 YFP-H	31
2.1.5 CXCR	32
2.2 Maus-Genotypisierung	33
2.2.1 DNS-Isolierung	33
2.2.2 DNS-Amplifizierung und -Aufreinigung	33
2.2.3 Quantitative Echtzeit-PCR	34
2.3 Intravitalmikroskopie	39
2.3.1 Implantation eines chronischen kraniellen Glasfensters	39
2.3.2 Zwei-Photonen-Intravitalmikroskopie	41
2.3.3 Bildbearbeitung und Datenanalyse	45
2.4 Immunhistochemische Färbungen	46
2.4.1 Gehirngewebefixierung mittels transkardialer Perfusion	46
2.4.2 Anfertigung von Mausgehirn-Vibratomechnitten	47
2.4.3 Färbeprotokolle für die Lichtmikroskopie	47
2.4.4 Konfokale Laserscanningmikroskopie	49
2.4.5 Bildbearbeitung und Datenanalyse	51
2.4.6 Färbeprotokolle für die Elektronenmikroskopie	52
2.4.7 Elektronenmikroskopie	58
2.5 Statistische Datenanalyse	58

3. ERGEBNISSE	59
3.1 Auswirkungen der <i>MAPT</i>-Transgenexpression auf die strukturelle Plastizität dendritischer Spines im P301S Tauopathie-Mausmodell.....	59
3.1.1 Tau-Pathologie in homozygoten Tau x YFP-Mäusen	59
3.1.2 Verminderte Spine-Dichte	60
3.1.3 Beeinträchtigte Spine-Kinetik	61
3.1.4 Morphologische Spine-Veränderungen.....	63
3.1.5 Spine-Pathologie ist unabhängig von Phospho-Tau.....	64
3.1.6 Tau-Nachweis in dendritischen Spines	66
3.1.7 Intravitalmikroskopie axonaler Boutons	68
3.1.8 Gehirnschnitt-Analyse prä- und postsynaptischer Spezialisierungen	69
3.1.9 Kortikaler Neuronenverlust.....	73
3.2 Auswirkungen modifizierter Fraktalkinrezeptor-Expression auf die kortikale Tau-Pathologie im P301S Tauopathie-Mausmodell	74
3.3 Überprüfung der Amyloid-Kaskaden-Hypothese: Tau- und Aβ-Pathologie im kombinierten Tau x APP PS1 Alzheimer-Mausmodell	77
3.3.1 Tau- und A β -Pathologie in Tau-, APP PS1- und Tau x APP PS1-Mäusen	77
3.3.2 Neuritische Plaques in APP PS1- und Tau x APP PS1-Mäusen	80
3.3.3 Spine-Dichten und -Kinetik in Tau-, Tau x APP PS1- und Wildtyp-Mäusen	82
3.3.4 Spine-Morphologie in Tau-, Tau x APP PS1- und Wildtyp-Mäusen.....	85
3.4 Elektronenmikroskopische Untersuchung der ultrastrukturellen Pathologie im 3xTg-AD Alzheimer-Mausmodell.....	87
3.4.1 Hippocampale A β - und Tau-Pathologie	87
3.4.2 Kortikale neuritische Dystrophien enthalten Phospho-Tau und A β	88
4. DISKUSSION.....	91
4.1 Synaptische Pathologie in Tauopathien	91
4.1.1 Veränderungen dendritischer Spines in Tauopathie-Mausmodellen	91
4.1.2 Gehirnregions-spezifische Fehlverteilung von Phospho-Tau in Spines	93
4.1.3 Auf der Suche nach der toxischen Tau-Spezies	94
4.2 Methodische Aspekte.....	95
4.2.1 Restriktionen der Synapsendichte-Untersuchungen an Gehirnpräparaten	95
4.2.2 Restriktionen der chronischen Intravitalmikroskopie.....	96
4.3 Die Rolle von Mikrogliazellen in Tauopathien	98
4.4 Kritische Betrachtung der Amyloid-Kaskaden-Hypothese	100
4.4.1 Histologische Läsionen I: Tau- und A β -Pathologie	100
4.4.2 Histologische Läsionen II: Neuritische Dystrophien	102
4.4.3 Einfluss von Tau- und A β -Pathologie auf dendritische Spines	104
4.4.4 Ausblick	107
5. LITERATUR	109

6. ANHANG	129
6.1 Abkürzungsverzeichnis	129
6.2 Abbildungsverzeichnis	131
6.3 Tabellenverzeichnis	132
7. DANKSAGUNG	133
8. LEBENSLAUF	134
9. EIGENE PUBLIKATIONEN	135

ZUSAMMENFASSUNG

In Zeiten des demografischen Wandels erfahren Krankheiten wie die Alzheimer-Demenz, als deren größter Risikofaktor das Alter gilt, einen rasanten Anstieg der Patientenzahl. Die Erforschung der zugrundeliegenden neurodegenerativen Mechanismen und das Einbringen daraus gewonnener Erkenntnisse in die Entwicklung von Therapieansätzen oder gar Präventionsmaßnahmen sind daher von gesamtgesellschaftlicher Bedeutung - nicht zuletzt auch unter ökonomischen Gesichtspunkten, wie den gleichsam wachsenden Kosten für das Gesundheitssystem.

In der vorliegenden Arbeit wurden neuropathologische Prozesse in verschiedenen transgenen Tauopathie-Mausmodellen mittels hochauflösender Mikroskopietechniken untersucht. Der Schwerpunkt lag hierbei auf der Analyse synaptischer Veränderungen im lebenden Tier, ermöglicht durch die Zwei-Photonen-Intravitalmikroskopie.

Zunächst wurden in Tau P301S-Mäusen die Auswirkungen FTDP-17-mutierten humanen Tau-Proteins auf die strukturelle Plastizität neokortikaler dendritischer Spines analysiert. Dabei wurde eine im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen verminderte Spinedichte gemessen, welche auf eine geringere Ausbildung neuer Spines zurückzuführen war. Die verbliebenen Spines zeigten morphologische Veränderungen wie ein vergrößertes Kopfvolumen - möglicher Weise zur Kompensation des Synapsenverlusts. Ergänzend wurde eine Methode zur immunhistochemischen Synapsendichtemessung an Gehirnschnitten etabliert, welche jedoch keine Effekte der Transgenexpression auf die Dichte prä- oder postsynaptischer Spezialisierungen offenbarte.

Um die Rolle inflammatorischer Prozesse in Tauopathien zu analysieren, wurde die Mauslinie Tau x CXCR erzeugt. Partielle oder vollständige genetische Fraktalkinrezeptor-Deletion in diesen Mäusen erlaubte eine gezielte Modifizierung der Kommunikation zwischen Neuronen und Mikrogliazellen. Die resultierende Aktivitätserhöhung der Mikrogliazellen hatte wider Erwarten keinen signifikanten Einfluss auf die Dichte Phospho-Tau enthaltender Zellen in den untersuchten kortikalen Gehirnregionen.

Zur Modellierung der Alzheimer-Demenz wurden Tau P301S-Mäuse mit der Linie APP PS1 verpaart. Die Nachkommen wiesen Alzheimer-typische histologische Läsionen wie extrazelluläre A β -Plaques und intrazelluläre Tau-Ablagerungen auf. Es konnte jedoch im Vergleich zur Ursprungslinie Tau P301S keine A β -induzierte Verstärkung der kortikalen Tau-Pathologie gemessen werden, welche die Amyloid-Kaskaden-Hypothese suggeriert. Eine intravitalmikroskopische Analyse dendritischer Spines in Tau P301S- und Tau x APP PS1-Mäusen in unterschiedlichen Krankheitsstadien sowie in Wildtyp-Wurfgeschwistern sollte die

Abgrenzung Tau-bedingter von A β -bedingten Effekten ermöglichen. Dabei wurden Veränderungen in der strukturellen Plastizität gefunden, beispielsweise in der Spine-Neubildung oder in bestimmten morphologischen Fraktionen, nicht aber in der absoluten Spinedichte.

Schließlich erfolgte eine elektronenmikroskopische Untersuchung neuritischer Dystrophien in einem weiteren Alzheimer-Mausmodell, der Linie 3xTg-AD. Durch immunhistochemische Markierung konnten sowohl A β - als auch Tau-Ansammlungen in den pathologischen Anschwellungen nachgewiesen werden.

Die präsentierten Befunde zeigen u. a. die ersten intravitalmikroskopischen Langzeitstudien dendritischer Spines in Mausmodellen mit reiner Tau-Pathologie sowie damit kombinierter A β -Pathologie. Sie bieten grundlegende, durch Patientenuntersuchungen nicht zu gewinnende Informationen über krankhafte synaptische Veränderungen, welche als frühe Ereignisse in der Alzheimer-Demenz betrachtet werden.

SUMMARY

In times of demographic changes, a rapidly increasing number of people get affected by diseases such as Alzheimer's disease. For this most common type of dementia, age is the main risk factor. Therefore, it is of great importance for the whole society to illuminate the underlying neurodegenerative mechanisms and to apply the gained knowledge to the development of therapeutic or even preventive procedures – not least for economic reasons, considering the simultaneously growing costs for the health care system.

In the presented study, neuropathological processes in different transgenic tauopathy mouse models were investigated by means of high-resolution microscopy. The main focus was set on the analysis of synaptic changes in the living animal, enabled by two-photon *in vivo* imaging.

At first, the effects of FTDP-17 mutated human tau-protein on the structural plasticity of neocortical dendritic spines were analysed in Tau P301S mice. In comparison to wildtype mice, the spine density was found to be reduced, which could be explained by a diminished fraction of newly formed spines. The remaining spines showed morphological changes such as an enlarged head volume, possibly compensating for the loss of synapses. Moreover, a method was established for immunohistochemical determination of synaptic densities on brain slices. However, no effect of transgene expression on the density of pre- or postsynaptic specializations could be measured.

For studying the role of inflammatory processes in tauopathies, the mouse line Tau x CXCR was bred. Partial or complete deletion of the fractalkine receptor gene in these mice allowed a selective modification of the communication between neurons and microglia. Unexpectedly, the resulting increase of microglia activity did not have an influence on the density of phospho-tau bearing cells in the analysed brain regions.

In order to create a model of Alzheimer's disease, Tau P301S mice were further crossed with the line APP PS1. The offspring showed histological lesions typical for this kind of dementia, such as extracellular A β -plaques and intracellular tau-deposits. However, in comparison to the founder line Tau P301S, no A β -induced enhancement of cortical tau pathology could be measured, unlike suggested by the amyloid-cascade-hypothesis. An *in vivo* analysis of dendritic spines in Tau P301S and Tau x APP PS1 mice at different stages of the disease, as well as in wildtype littermates, allowed to distinguish effects caused by tau from those caused by A β . Thereby, changes in structural plasticity such as the emergence of new spines or the distribution of morphological fractions were detected, while the overall spine density was unaffected.

Finally, neuritic dystrophies were analysed in another Alzheimer's disease mouse model, the line 3xTg-AD, applying electron microscopy. By immunohistochemical labelling, A β - as well as tau-deposits could be detected inside the pathological swellings.

The presented data show the first *in vivo* long-term study on dendritic spines in mouse models with tau-pathology only as well as in combination with A β -pathology. They provide new basic information about synaptic failure, which is considered to be an early event in Alzheimer's disease and can not be obtained from patient studies likewise.

1. EINLEITUNG

1.1 Neurodegenerative Erkrankungen

“Orandum est, ut sit mens sana in corpore sano.” (Juvenal, Satire 10, Zeile 356; Adamietz, 1993) – „Man möge [anstelle weltlicher Güter] dafür beten, dass ein gesunder Geist in einem gesunden Körper sei“. Dieses oftmals verkürzt wiedergegebene Zitat des römischen Dichters Juvenal (ca. 65-130 n. Chr.) ist heute, im 21. Jahrhundert, aktueller denn je: Dank weltweit wachsendem Wohlstand, verbesserter Hygiene und medizinischer Versorgung nimmt nicht nur die Gesamtbevölkerung, sondern auch die Lebenserwartung zu – insbesondere in den sogenannten Entwicklungsländern (UNFPA und HelpAge International, 2012). Auf der Kehrseite des demografischen Wandels findet sich jedoch ein starker Anstieg neurodegenerativer Erkrankungen wie der Alzheimer-Demenz (AD; Batsch und Mittelman, 2012). Die wesensändernden Symptome dieser Krankheit, als deren größter Risikofaktor das Alter gilt, werden immer offener gesellschaftlich thematisiert, wie die prominenten Beispiele Ronald Reagan, Walter Jens oder Gunter Sachs zeigen. Auch andere pathologische Veränderungen des Nervensystems können zu einer Dissoziation von Körper und Geist in Form motorischer oder mentaler Einschränkungen führen. Medizinische Hilfe scheitert oftmals bereits an einer zuverlässigen Diagnose; viele zugelassene Medikamente sind symptommindernd, aber nicht heilend oder gar präventiv. Daher ist (anstelle oder in Ergänzung hoffnungsvollen Betens) die naturwissenschaftliche Ergründung neurodegenerativer Erkrankungen ein wichtiges Forschungsfeld und zugleich eine große Herausforderung.

Neurodegenerative Erkrankungen (von gr.: neuro = Nerv und lat. degenerare = entarten) sind zumeist sporadisch auftretende, seltener erblich bedingte pathologische Prozesse, die einzelne Neuronenpopulationen oder das gesamte Zentralnervensystem (ZNS) betreffen. Der langsam fortschreitende neuronale Funktionsverlust reicht von synaptischen Beeinträchtigungen bis hin zum massenhaften Absterben der Nervenzellen mit resultierender Gehirnatrophie und entsprechenden Implikationen für die Patienten. So lässt sich diese heterogene Krankheitsgruppe klinisch klassifizieren in Demenzen (von lat.: de = abnehmend und mens = Geist, Verstand) und Bewegungsstörungen oder alternativ molekularbiologisch unterteilen anhand der zugrundeliegenden Proteinopathien in Tauopathien, Synucleinopathien, TDP-43 Proteinopathien, FUSopathien und Prionen-Erkrankungen.

1.2 Tauopathien

Demenzielle Erkrankungen werden deutlich dominiert von der AD, welche bei 50-75% der Patienten diagnostiziert wird; weitere 5-10% der Betroffenen leiden an Frontotemporaler Demenz (Prince und Jackson, 2009). Beide Demenz-Formen zählen zu den neurologischen Erkrankungen mit Tau-Pathologie (Tauopathien; **Tab. 1**), zeichnen sich also durch Störungen im Tau-Proteinmetabolismus aus.

Tab. 1 Erkrankungen mit neuronaler Tau-Pathologie (nach Spires-Jones et al., 2009)

Frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus (FTDP-17)
Alzheimer-Demenz
Progressive supranukleäre Blickparese
Pick-Krankheit
Silberkornkrankheit
Kortikobasale Degeneration
Progressive subkortikale Gliose
Amyotrophe Lateralsklerose
Diffuse neurofibrilläre Tangles mit Kalkablagerungen
Dementia Pugilistica
Nur-Tangle Demenz
Down-Syndrom
Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom
Hallervorden-Spatz-Syndrom
Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
Multisystematrophie
Niemann-Pick-Krankheit, Typ C
Zerebrale Amyloidangiopathie des Prionproteintyps
Subakute sklerosierende Panenzephalitis
Myotone Dystrophie
Nicht-guamanische Motoneuronerkrankung mit neurofibrillären Bündeln
Postenzephalitischer Parkinsonismus

1.2.1 (Patho-) Physiologie des Tau-Proteins

Das Tau-Protein (von engl.: tubulin associated unit) wurde als eines der ersten Mikrotubuli-assoziierten Proteine charakterisiert (Weingarten et al., 1975). Es ist hauptsächlich in ZNS-Axonen lokalisiert (Binder et al., 1985). Variable Expression des auf Chromosom 17q21 kodierten, aus 16 Exons bestehenden humanen *MAPT*-Gens (von engl.: microtubule associated protein tau; Neve et al., 1986) resultiert in 6 Tau-Isoformen (**Abb. 1**; Goedert et al., 1989). Diese enthalten jeweils zur Hälfte 3 bzw. 4 imperfekte C-terminale Repeat-Regionen von 31 bis 32 Aminosäuren Länge (3/4R-Tau) und unterscheiden sich in der Anzahl N-terminaler Abschnitte (0/1/2N-Tau). Außerdem konnte im peripheren

Nervensystem eine siebte, hochmolekulare (695 Aminosäuren lange) Tau-Isoform nachgewiesen werden (Goedert et al., 1992a). Während der Embryonalentwicklung wird nur die kürzeste Tau-Isoform ohne die Sequenzen der Exons 2, 3 und 10 exprimiert (Goedert et al., 1989b). Im Erwachsenen werden dann alle 6 Isoformen gebildet, wobei ein Expressions-Gleichgewicht zwischen 3R- und 4R-Tau herrscht. Das *MAPT*-Gen anderer Säugetiere ist ähnlich organisiert wie das humane Homolog. Murine Tau-Isoformen sind jedoch mit 341 bis 430 Aminosäuren kürzer und unterscheiden sich zudem in der C-terminalen Gensequenz (Lee et al., 1988).

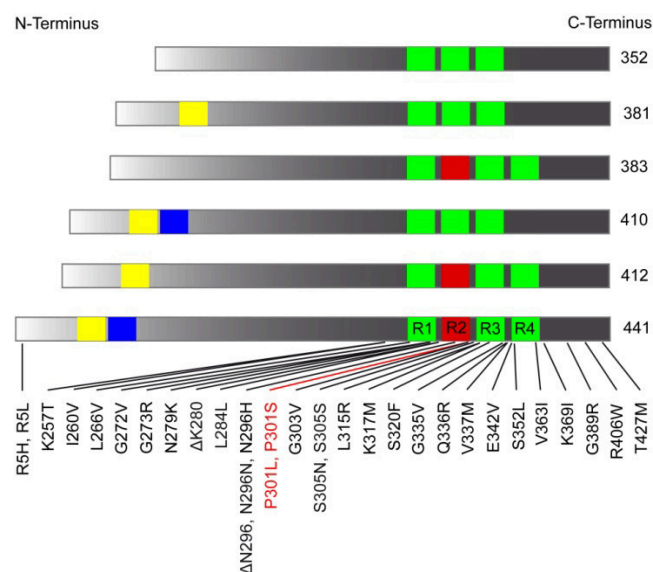


Abb. 1: Humane Tau-Isoformen und FTDP-17 Mutationen

Durch alternatives Spleißen der Exons 2 (gelb), 3 (blau) und 10 (rot) entstehen 6 Tau-Isoformen zwischen 352 und 441 Aminosäuren Länge. Viele der mit FTDP-17 assoziierten *MAPT*-Mutationen befinden sich in den Mikrotubuli-bindenden Repeat-Regionen (R1 bis 4; grün und rot). Rot markiert sind die Punktmutationen P301L und P301S in R2, welche in die im Rahmen dieser Dissertation untersuchten transgenen Mausmodelle Tau P301S und 3xTg-AD eingebracht wurden (nach Spies-Jones et al., 2009).

Das nativ ungefaltete Tau-Protein bindet an die Oberfläche von Mikrotubuli und fördert deren Formation aus Tubulin-Untereinheiten (**Abb. 2**; Weingarten et al., 1975). Die Bindung erfolgt über Wechselwirkungen innerhalb der Repeat-Regionen mit α - und β -Tubulin-Molekülen, weshalb 4R-Tau-Isoformen eine höhere Affinität zu Mikrotubuli aufweisen als 3R-Tau-Isoformen. Diese Interaktion ist dynamischer Natur und wird u. a. durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung des Tau-Proteins reguliert. Nicht zuletzt aufgrund der Vielfalt seiner strukturellen Konformationen hat das Tau-Protein neben seiner hohen Mikrotubuli-Bindungskapazität Dutzende weitere Interaktionspartner (Morris et al.,

2011). Dazu zählen andere Zytoskelettproteine (F-Aktin, Neurofilamente), Kinasen (GSK3 β , Fyn, Src, Lck, Pi3K) und Phosphatasen (PP1/2A/2B/5), Motorproteine (Dynaktin, Kinesin), Chaperone (Hsp27/70/90, Pin1, CHIP) und Membranproteine (Annexin A2 und andere MAPs) (Mandelkow und Mandelkow, 2012). Dies erklärt die Beteiligung des Proteins an Prozessen der Zellteilung, -polarisierung und -differenzierung.

In Tauopathien liegt das Tau-Protein in veränderter Form vor (Mandelkow und Mandelkow, 2012): Zu den pathologischen Anomalien zählen biochemische Modifikationen wie (Hyper-)Phosphorylierung, proteolytische Prozessierung, Ubiquitinierung, Glykierung, Glykosylierung, Oxidierung, Nitrierung oder Acetylierung. Auch *MAPT*-Mutationen sowie eine veränderte Isoformen-Verteilung können Tauopathien verursachen. FTDP-17-assoziierte *MAPT*-Mutationen (**Abb. 1**; siehe Kapitel 1.2.2) schwächen die Interaktion des Tau-Proteins mit Mikrotubuli und beeinträchtigen somit deren Assemblierung (Pickering-Brown et al., 2000). In ähnlicher Weise verursacht Tau-Hyperphosphorylierung die Ablösung des Proteins von den Mikrotubuli, dessen Fehlverteilung vom axonalen ins somatodendritische Kompartiment, sowie die Protein-Aggregation zu paarigen helikalen Filamenten (PHF) und neurofibrillären Tangles (NFTs; **Abb. 2** und **Abb. 3E, F**). Diese pathologischen Ablagerungen des nativ durch hohe Löslichkeit charakterisierten Tau-Proteins werden durch kurze hydrophobe Motive ermöglicht, welche β -Faltblattstrukturen ausbilden. Aus diesem Fibrillenkern ragen die unstrukturierten N- und C-terminalen Domänen des Tau-Proteins in Form einer zweilagigen Polyelektrolyt-Bürste, welche zelluläre Interaktionen beeinträchtigt und gleichzeitig die Entstehung von NFTs erleichtert (Wegmann et al., 2013).

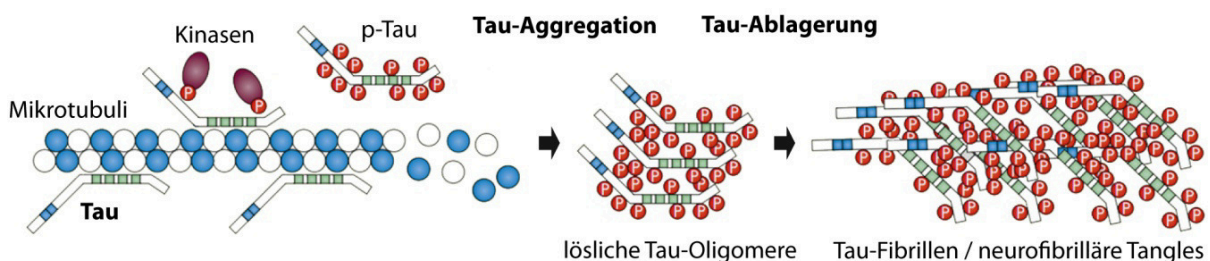


Abb. 2: Hyperphosphorylierung und Aggregation des Tau-Proteins

In gesunden Neuronen ist das Tau-Protein (blau: Exons 2 und 3, grün: Repeat-Regionen) hauptsächlich axonal lokalisiert. Dort bindet es an Mikrotubuli (α - und β -Tubulin-Untereinheiten in weiß und blau) und stabilisiert diese somit. In Tauopathien wird das Protein durch vermehrte Kinase- bzw. verminderte Phosphatase-Aktivität hyperphosphoryliert (p-Tau mit roten Phosphatgruppen). Das schwächt seine Bindungskapazität, sodass Tau von den Mikrotubuli dissoziiert und diese infolgedessen depolymerisieren. Die ungebundenen Tau-Monomere aggregieren zunächst zu löslichen Oligomeren im Zytosol, bevor sich die charakteristischen somatodendritischen Ablagerungen in Form von Neuropilfäden und NFTs bilden (modifiziert nach Götz und Ittner, 2008).

1.2.2 FTDP-17: *MAPT*-Mutationen als Ursache Frontotemporaler Demenz

Die Frontotemporalen Demenzen (FTD) umfassen eine heterogene Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen, die entsprechend ihrer Bezeichnung vor allem die Stirn- (lat.: *Lobi frontales*) und Schläfenlappen (lat.: *Lobi temporales*) des Großhirns betreffen; oftmals zeigen auch weitere subkortikale Regionen pathologische Merkmale (Goedert et al., 2011). Das resultierende Krankheitsbild zeichnet sich nicht primär durch eine verminderte Gedächtnisleistung aus, sondern vielmehr durch unterschiedliche Verhaltens-, Sprach- und Bewegungsstörungen, welche schließlich eine Persönlichkeitsveränderung bedingen. Eine erstmalige Beschreibung kortikaler Lappenatrophie mit direkter Korrelation zur Aphasie des Patienten erfolgte bereits zum Ende des 19. Jahrhunderts durch den deutschen Arzt Arnold Pick (1851-1924; Pick, 1892). Gut hundert Jahre später wurden die ersten dominant vererbten FTD-Formen identifiziert (Hutton et al., 1998; Spillantini et al., 1998), an welchen jedoch nur etwa jeder zehnte Patient leidet. Hierzu zählt auch die durch charakteristische 3R- und/oder 4R-Tau-Aggregate gekennzeichnete Frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus assoziiert mit Chromosom 17 (FTDP-17; Foster et al., 1997).

FTDP-17 Patienten weisen eine Atrophie der Stirn- und Schläfenlappen sowie der zum motorischen System gehörigen Basalganglien und Substantia nigra auf. Unter Bezugnahme auf die resultierenden Symptome erfolgt eine Unterteilung in Demenz- oder Parkinsonismus-dominante Varianten. Besondere Bedeutung erlangte die Erkrankung durch die Entdeckung von mittlerweile mehr als 30 mit FTDP-17 assoziierten *MAPT*-Mutationen in über 100 Familien (**Abb. 1**; Spires-Jones et al., 2009): Während lange Zeit unklar war, ob Tau-Pathologie Krankheitsursache oder -folge ist, wurde dadurch der genetische Beweis für einen kausalen Zusammenhang des Tau-Proteins mit neurodegenerativen Prozessen erbracht. Die Hälfte der häufig in einer der vier Repeat-Regionen zu findenden *MAPT*-Mutationen zeigt Primäreffekte auf der Protein-Ebene. Sie beeinflussen die Mikrotubuli-Bindungseigenschaften des Tau-Proteins und fördern dessen Aggregationsneigung, was zur Ausbildung fibrillärer Ablagerungen führt. Andere Mutationen wirken sich auf der RNA-Ebene aus und können so eine Verschiebung des Expressions-Verhältnisses der sechs Tau-Isoformen verursachen, meist zugunsten der 4R-Isoformen (Goedert und Jakes, 2005).

Der wichtigen Erkenntnis, dass toxische Dysfunktion infolge von *MAPT*-Mutationen alleine Neurodegeneration verursachen kann, verdankt das Tau-Protein seine zentrale Rolle in diesem Forschungsgebiet. Außerdem wurde somit der Grundstein zur Erzeugung neuer transgener Mausmodelle gelegt (siehe Kapitel 1.4), welche auch zu einem besseren Verständnis anderer Tauopathien wie der AD verhelfen.

1.2.3 Alzheimer-Demenz

Der Begriff Alzheimer-Demenz oder Alzheimersche Krankheit (lat.: *Morbus Alzheimer*) ist zurückzuführen auf den deutschen Psychiater und Neuropathologen Alois Alzheimer (1864-1915; **Abb. 3A**). 1901 wurde diesem an der psychiatrischen Klinik in Frankfurt am Main Auguste Deter (**Abb. 3B**) vorgestellt, welche später in die Medizingeschichte eingehen sollte: Die Patientin zeigte bereits im Alter von 51 Jahren offenkundig starke Anzeichen einer Demenz und äußerte reflektierend „Ich habe mich sozusagen selbst verloren“ (Alzheimer, 1901). Alois Alzheimer nannte ihr Krankheitsbild „die Krankheit des Vergessens“ (Alzheimer, 1901). Nach Auguste Deters Tod veröffentlichte er seinen Fachartikel „Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde“ (Alzheimer, 1907), in welchem er ihre geistige Verwirrtheit mit histopathologischen Veränderungen im Kortex korrelierte. So beschrieb und zeichnete er erstmalig die charakteristischen extrazellulären amyloiden Plaques sowie intrazellulären NFTs (**Abb. 3C-F**). Die offizielle Namensgebung der AD erfolgte ein paar Jahre später durch Alois Alzheimers Vorgesetzten Emil Kraepelin in seinem „Lehrbuch der Psychiatrie“ (Kraepelin, 1910).

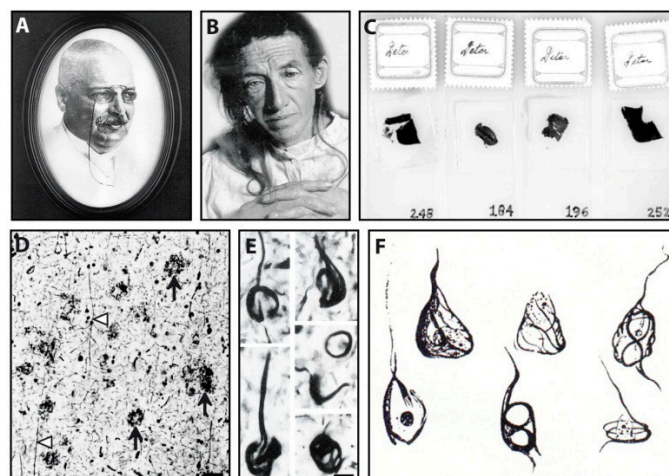


Abb. 3: Die Krankheit des Vergessens

A, Portrait von Alois Alzheimer, der die nach ihm benannte Demenz-Form 1907 erstmalig beschrieb. **B**, Alzheimers Patientin Auguste Deter gilt als die medizingeschichtlich erste Alzheimer-Kranke (Foto aus Maurer et al., 1997). **C**, Gehirnpräparate von Auguste Deter, nach der Bielschowsky Silberfärbung (für Aufnahmen zur Verfügung gestellt von Prof. Hans Kretschmar, Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München). **D**, Lichtmikroskopische Aufnahmen der Hirnrindenpräparate zeigen markante extrazelluläre Plaques (Pfeile) sowie intrazelluläre Neuropilfäden (Pfeilköpfe). **E**, NFTs in unterschiedlichen Erscheinungsformen. **F**, Alois Alzheimers filigrane NFT-Zeichnungen (Alzheimer, 1911). Maßstäbe: **D** 25µm, **E** 5µm.

Anders als bei Auguste Deter, welche an einer erblichen, früh einsetzenden AD-Variante litt (Müller et al., 2012), tritt die Erkrankung in über 90% der Fälle sporadisch und im fortgeschrittenen Alter auf. Während etwa 15% der 65-Jährigen betroffen sind, steigt die Wahrscheinlichkeit einer AD-Diagnose danach exponentiell an. Die Krankheit zeichnet sich durch ein sehr langes präklinisches Stadium aus. So lassen sich in Patienten mit autosomal dominant vererbter AD Biomarker-Veränderungen sogar bis zu 25 Jahre vor dem voraussichtlichen Einsetzen klinischer Symptome messen (Bateman et al., 2012). Im Früh- und Mittelstadium führt die Erkrankung zu moderaten bis starken kognitiven Beeinträchtigungen in der Gedächtnis-, Aufmerksamkeits- und Wahrnehmungsleistung. Im Spätstadium kommen erhebliche Störungen von Sprache, Stimmung und Verhalten hinzu, weshalb sich das neuropsychologische AD-Profil dann schwer von dem anderer Demenzen wie Primär-progressiver Aphasie oder FTD unterscheiden lässt (Weintraub et al., 2012).

Die postmortale Diagnosestellung erfolgt heute anhand folgender charakteristischer Hirngewebeveränderungen, welche bereits Alois Alzheimer erwähnte (**Abb. 3 D-F**): Amyloid-β(A β)-Proteinablagerungen in Form seniler Plaques und zerebraler Amyloidangiopathie, sowie intraneuronale Aggregation von abnorm phosphoryliertem Tau-Protein, welches Neuropilfäden und NFTs (auch Alzheimer-Neurofibrillenveränderungen genannt; Thal und Braak, 2005) bildet (siehe Kapitel 1.2.1). AD-PHFs bestehen aus allen 6 Tau-Isoformen; diese liegen in voller Länge und hyperphosphoryliert vor (Goedert et al., 1988, 1992b). In der unmittelbaren Umgebung seniler Plaques sind zudem Gewebeschädigungen in Form dystropher Neuriten mit Tau-Pathologie zu finden (neuritische Plaques). A β -Plaques lassen sich Anhand morphologischer Merkmale unterteilen in diffuse Plaques, subpiales bandartiges Amyloid, Lake-like Amyloid, Fleecy Amyloid, klassische kernhaltige (engl.: cored) Plaques, Core-only-Plaques und Marklagerplaques (Thal und Braak, 2005). Die AD-Stadieneinteilung beruht auf der progressiven Ausbreitung der Tau-Pathologie, welche den A β -Proteinablagerungen vorausgeht (Braak et al., 2011). So werden nach Braak und Braak (1991) die NFT-Stadien I-VI und/oder anhand der neuritischen Plaques die CERAD-Scores 0-3 unterschieden (CERAD: Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease; Mirra et al., 1991). Die Anfärbung der pathologischen Proteine erfolgt dabei entweder immunhistochemisch mittels spezifischer Antikörper (z. B. AT8 Anti-Tau oder 4G8 Anti-A β) oder durch Färbemethoden wie die Gallyas, Campbell-Switzer, Bodian oder Bielschowsky Silbertechniken, welche die argyrophilen Eigenschaften der Aggregate zunutze machen (Uchihara, 2007). Neben den oben genannten Proteinablagerungen zeigt das AD-Gehirn klassische neurodegenerative Merkmale wie Synapsen- und Neuronenverlust, Atrophie und Gliose. AD-typische Läsionen wie Tau- und A β -Pathologie können zudem auch bei Hirnverletzungen durch äußere Gewalteinwirkungen ausgelöst werden, wie durch Chronisch-

traumatische Enzephalopathie (lat.: *Dementia Pugilistica*), welche bei Berufsboxern häufig auftritt (Blennow et al., 2012).

Während zahlreiche *MAPT*-Mutationen als Ursachen Frontotemporaler Demenzen wie FTDP-17 gefunden wurden (siehe Kapitel 1.2.2), konnte bislang kein eindeutiger derartiger Zusammenhang einer genetisch bedingten Dysfunktion des Tau-Proteins mit der AD hergestellt werden. Vielmehr wurden AD-assoziierte Mutationen in anderen Genen entdeckt, welche auf Veränderungen des A β -Proteinmetabolismus als primäre Krankheitsursache schließen lassen. Wenngleich nicht einmal jeder zehnte AD-Patient an einer erblichen AD-Variante erkrankt ist, ähneln sich die sporadische und familiäre Alzheimer-Demenz (FAD) histopathologisch und in ihren klinischen Ausprägungen so stark, dass gemeinsame kausale Mechanismen naheliegen.

Das A β -Peptid, welches den Hauptbestandteil der senilen Plaques ausmacht (Glenner und Wong, 1984a), zeigt eine starke Neigung zur Aggregation und Ausbildung von Fibrillen mit einem hohen Anteil an β -Faltblattstrukturen. Amyloidablagerungen (von gr.: amylo = Stärke) aus beispielsweise A β -Protein, Lysozym oder Apolipoproteinen werden histopathologisch mit Kongorot nachgewiesen, sind aber meist auch wie stärkeähnliche Substanzen durch Iodreagenzien anfärbbar (Iod-Stärke-Reaktion), was ihre Namensherkunft erklärt. Das A β -Protein entsteht durch posttranslationale Modifikation des Amyloid Vorläuferproteins APP (von engl.: amyloid precursor protein; Golde et al., 1992 ; **Abb. 4**). Dieses Transmembranprotein wird dabei sequenziell von spezifischen Enzymen, den α -, β - und γ -Sekretasen, abgebaut. Die Bezeichnung „Sekretase“ für die involvierten Proteasen verweist auf die Sekretion der proteolytischen Spaltprodukte. Nach den dabei resultierenden Endprodukten unterscheidet man die amyloidogene von der nicht-amyloidogenen APP-Prozessierung (Haass et al., 2012): In Letzterer wird APP zunächst von der α -Sekretase innerhalb der A β -Sequenz gespalten und die lösliche N-terminale Ektodomäne (sAPP α) ins Lumen freigesetzt. Darauf folgende γ -Sekretase-Aktivität bewirkt eine Spaltung in der Transmembrandomäne und erzeugt dadurch ein intrazelluläres C-terminales Fragment (engl.: APP intracellular domain, AICD) sowie ein lösliches 3 kDa großes Peptid (p3). Die β -Sekretase, auch BACE genannt (von engl. β -site APP cleaving enzyme), leitet hingegen die amyloidogene APP-Prozessierung ein durch Freisetzung der sAPP β Ektodomäne. Weitere Proteolyse durch die γ -Sekretase resultiert in diesem Fall neben der AICD-Bildung in der Sekretion des A β -Proteins. In Abhängigkeit von der Enzymschnittstelle beträgt dessen Länge 37 bis 43 Aminosäuren, wobei A β_{40} im gesunden Organismus die häufigste, A β_{42} hingegen die stärker fibrillogene und neurotoxische Form ist (Garai und Frieden, 2013).

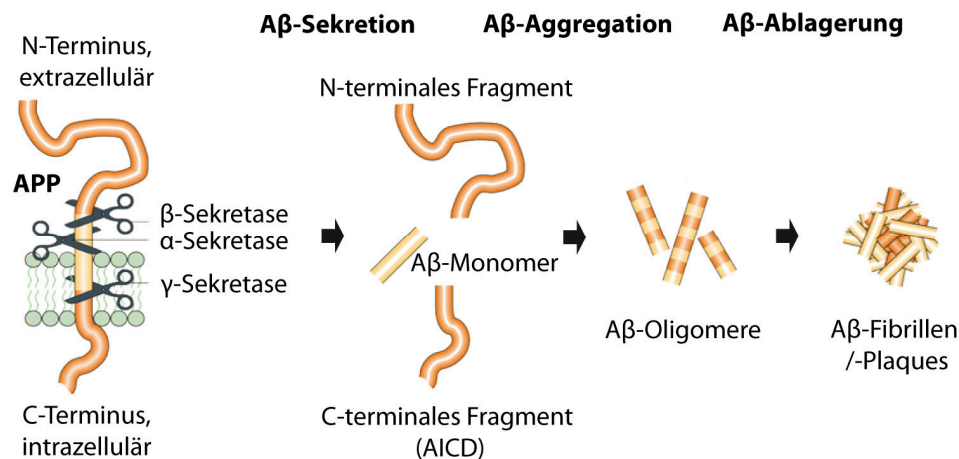


Abb. 4: APP-Prozessierung und Aβ-Aggregation

Hauptbestandteil der für den Morbus Alzheimer charakteristischen extrazellulären Plaques sind 40 bis 42 Aminosäuren lange Aβ-Peptide. Diese entstehen durch sequenzielle Proteolyse des Amyloid Vorläuferproteins APP. Dabei generiert zunächst die β-Sekretase den Amino-Terminus des Aβ-Monomers. Nachfolgende γ-Sekretase-Aktivität reguliert die Länge des amyloidogenen Proteins. Die sekretierten Aβ-Monomere aggregieren zu toxischen Oligomeren, welche sich schließlich als fibrilläre Plaques ablagern. Außerdem werden bei der APP-Spaltung N- sowie C-terminale (AICD) Fragmente freigesetzt. Alternativ leitet die α-Sekretase durch Schneiden innerhalb der Aβ-Sequenz die nicht-amyloidogene APP-Prozessierung ein (modifiziert nach Götz und Ittner, 2008).

Mittlerweile wurden hunderte FAD-assoziierte Mutationen beschrieben, davon 24 (plus Duplikationen) im *APP*-, 185 im *PSEN1*- und 14 im *PSEN2*-Gen (Tanzi, 2012). Das *APP*-Gen liegt auf Chromosom 21 und schon lange ist ein Zusammenhang des Down-Syndroms mit der AD bekannt, an welcher alle Trisomie-21-Patienten frühzeitig erkranken (Glenner und Wong, 1984b). Kürzlich wurde erstmalig eine sehr seltene protektive *APP*-Mutation gefunden, welche das Risiko vermindert, an sporadischer AD zu erkranken und die altersbedingte Beeinträchtigung kognitiver Fähigkeiten verlangsamt (Jonsson et al., 2012). Die FAD-assoziierten *APP*-Mutationen befinden sich in der Nähe der Sekretase-Schnittstellen und nehmen so Einfluss auf die APP-Prozessierung. Auch die Präseniline 1 und 2, welche durch die *PSEN1*- und *PSEN2*-Gene kodiert werden und katalytische Untereinheiten der γ-Sekretase bilden, sind in die Aβ-Freisetzung involviert. Außer den bekannten *APP*-, *PSEN1*- und *PSEN2*-Mutationen, welche früh einsetzende FAD verursachen, spielen nach auf Zwillings- und Familienstudien basierenden Schätzungen in 80% aller AD-Fälle andere erbliche Faktoren sowie Umwelteinflüsse eine wichtige Rolle (Gatz et al., 2006). Zudem wurden in genomweiten Assoziationsstudien zur sporadischen AD weitere Kandidatengene identifiziert, von denen viele den Aβ-Metabolismus beeinflussen, so z. B. *APOE*, *CD33*, *CLU*, *CR1*, *PICALM*, *ATXN1* und *BIN1* (Tanzi, 2012). Fast alle AD-assoziierten Genmutationen führen zu einer Modifikation des Verhältnisses von Aβ₄₂:Aβ₄₀

zugunsten des längeren Peptids. Dies fördert die A β -Aggregation, Fibrillen- und Plaquebildung (Garai und Frieden, 2013).

Zur Art und Abfolge der pathologischen Ereignisse, welche schließlich in der AD mit Plaque- und Tangle-Pathologie resultieren, gibt es viele Theorien. Wohl etabliert, wenngleich nicht gänzlich unbestritten ist die Amyloid-Kaskaden-Hypothese (Hardy und Allsop, 1991; Hardy und Selkoe, 2002), welche durch die Entdeckung oben genannter *FAD*-Mutationen unterstützt wird. Sie setzt abnormen A β -Metabolismus als Auslöser an den Anfang einer kausalen Sequenz. Die Tau-Pathologie nimmt eine sekundäre Rolle ein, dabei jedoch dem Neuronenverlust vorangehend (**Abb. 5**). In der klassischen Amyloid-Kaskaden-Hypothese gelten extrazelluläre Ablagerungen als primäre neurotoxische A β -Form. Zweifel daran rief nicht zuletzt die noch immer fortgeführte sogenannte „Nonnenstudie“ hervor, in welcher einige Ordensschwwestern mit starker A β -Plaque-Pathologie, jedoch ohne demenzielle Symptome gefunden wurden (Snowdon, 1997). Unter Einbezug neuer Forschungsergebnisse wird heute in einer modifizierten Hypothesenvariante der intrazellulären Akkumulation von A β -Peptiden in Form von Monomeren und Oligomeren zentrale Bedeutung zugemessen (Wirths et al., 2004).

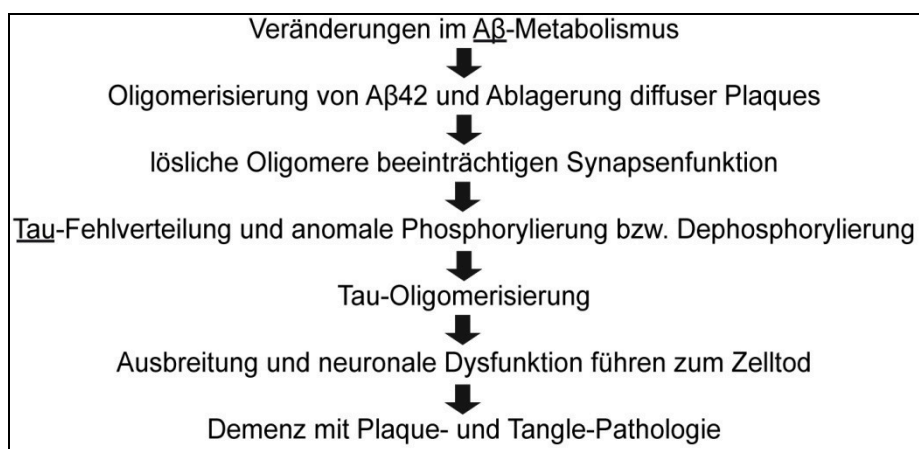


Abb. 5: Amyloid-Kaskaden-Hypothese der Alzheimer-Demenz

Gemäß der Amyloid-Kaskaden-Hypothese stehen Veränderungen im A β -Metabolismus zu Beginn des pathologischen Prozesses, der schließlich zum Morbus Alzheimer führt. Erst einige Stufen tiefer in der kaskadenartigen Wirkungskette (Pfeile) folgt die Tau-Pathologie. Viele Details, insbesondere bezüglich der mechanistischen Zusammenhänge, sind noch weitestgehend ungeklärt (modifiziert nach Haass, 2010).

1.3 Neurodegeneration und Inflammation

Zur Ätiologie der AD wurden neben der prominenten Amyloid-Kaskaden-Hypothese auch andere Theorien aufgestellt, die beispielsweise inflammatorische Prozesse als auslösende Faktoren postulieren. Die Entzündungs-Hypothese der AD stützt sich dabei auf Befunde wie die verstärkte Expression von Entzündungsmediatoren in AD-Gehirnen sowie ein vermindertes Krankheitsrisiko nach langzeitiger Einnahme entzündungshemmender Medikamente (Breitner et al., 1994; Heneka et al., 2013; McGeer et al., 1990). Aufgrund der Komplexität inflammatorischer Abläufe auf zellulärer und molekularer Ebene ist deren (auslösende / beitragende / sekundäre) Rolle in der AD-Pathogenese jedoch weiterhin Gegenstand kontroverser Debatten (Wyss-Coray und Rogers, 2012).

Tauopathien und andere neurodegenerative Erkrankungen werden in der Regel von akuten oder chronischen Entzündungsprozessen begleitet, welche sich auf zellulärer Ebene in Form einer Gliose manifestieren. Dabei erfolgt die Aktivierung, Proliferation und Rekrutierung verschiedener Gliazell-Typen. Noch vor dem Auftreten aktivierter Oligodendrozyten und Astrozyten kann meist das Einwandern hypertropher Mikrogliazellen festgestellt werden.

Mikrogliazellen übernehmen als aktive Immunabwehr des ZNS wichtige Aufgaben im gesunden und pathologischen Gehirn (Hanisch und Kettenmann, 2007). Sie werden oft als residenzielle Makrophagen des Gehirns bezeichnet, wobei sie auch im nicht-aktivierten „Ruhestadium“ permanent mittels ihrer feinen, hochmotilen Ausläufer die parenchymale Homöostase überwachen (Nimmerjahn et al., 2005). Dabei bilden Mikrogliazellen ein regelmäßiges Netzwerk mit diskreten, nicht-überlappenden Kontrollbereichen der einzelnen Zellen. Eine Vielzahl spezifischer Rezeptoren an der Zelloberfläche ermöglicht die hochsensitive Detektion von Signalmolekülen. Diese werden auch von intakten Neuronen ausgeschüttet, welche andererseits unter physiologischen Bedingungen neurotrophe Faktoren von Mikrogliazellen empfangen. Durch das Beseitigen potenzieller Pathogene und die Sekretion gewebergenerativer Faktoren tragen Mikrogliazellen zum Schutz des gesunden Nervensystems bei. Während der Gehirnentwicklung können Mikrogliazellen hingegen apoptotischen Zelltod in Neuronen induzieren (Bessis et al., 2007) und sie sind zudem – auch im adulten Organismus – an der Regulierung synaptischer Kontakte beteiligt (Wake et al., 2009, 2013; Kettenmann et al., 2013; siehe Kapitel 1.5.2).

In Krankheiten wie der AD wird Mikrogliazellen eine ambivalente Rolle zuteil (Dickson, 1999; Hanisch und Kettenmann, 2007): Einerseits können die amöboiden Zellen neuroprotektiv wirken, da sie durch Internalisierung und Abbau löslicher und fibrillärer A β -Moleküle der Plaque-Ablagerung entgegenwirken (Lee und Landreth, 2010). Auf der anderen

Seite zeigen durch aktivierte Mikrogliazellen hervorgerufene Entzündungsreaktionen oftmals schädliche, krankheitsfördernde Auswirkungen auf das Nervensystem bis hin zur Neurotoxizität und Eliminierung kompletter Zellen (Fuhrmann et al., 2010; Heneka et al., 2013).

Eine Verstärkung der Tau-Pathologie nach Aktivierung von Mikrogliazellen wurde in verschiedenen Tauopathie-Mausmodellen nachgewiesen (Bhaskar et al., 2010; Kitazawa et al., 2005), wobei dem Fraktalkinrezeptor CX₃CR1 (von engl.: C-X3-C motif receptor 1) eine kritische Rolle zukommt: Das von Neuronen sekretierte Chemokin Fraktalkin hat nach Bindung an diesen Transmembranrezeptor, welcher fast ausschließlich von Mikrogliazellen exprimiert wird (Harrison et al., 1998), eine beruhigende Wirkung auf die Zielzelle. Genetische Deletion des Rezeptors hingegen führt zu einer erhöhten Aktivität der Mikrogliazellen, welche daraufhin inflammatorische Zytokine (z. B. Interleukin-1) absondern und somit wiederum neuronale Tau-Kinasen (z. B. p38 MAPK) aktivieren (Bhaskar et al., 2010). Dazu passend bewirkt eine Fraktalkin-Überexpression in einem weiteren Tauopathie-Mausmodell eine reduzierte Mikrogliazell-Aktivität und geringere Tau-Pathologie bis hin zur Prävention von Neuronenverlust (Nash et al., 2013).

Protektive Effekte zeigt ein *Cx3cr1*-Knockout hingegen in einem dreifach-transgenen AD-Mausmodell, in welchem dadurch eine Neurodegeneration verhindert wird (Fuhrmann et al., 2010), und in zwei weiteren AD-Mausmodellen in Form einer Abnahme der A β -Plaques und dystropher Neuriten bei erhöhter Phagozytose-Aktivität der Mikrogliazellen (Lee et al., 2010). In anderen Studien konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen dem Fraktalkin-Signalweg und der A β -Pathologie hergestellt werden (Nash et al., 2013). Der generelle Einfluss der Gliazellen auf AD-typische Läsionen wird zudem relativiert durch Studien, in welchen die nahezu vollständige genetische Entfernung von Mikrogliazellen keinerlei Effekte auf die Ausbildung von amyloiden Plaques oder neuritischen Dystrophien in AD-Mausmodellen zeigt (Grathwohl et al., 2009). Andererseits wurden in AD-Patienten eine verringerte Fraktalkin-Expression und eine erhöhte Dichte aktivierter Mikrogliazellen gemessen, welche mit der kognitiven Leistungsabnahme korrelieren (Cho et al., 2011; Edison et al., 2008; Kim et al., 2008).

So bleibt die Rolle inflammatorischer Prozesse und insbesondere der Mikrogliazellen in neurodegenerativen Erkrankungen umstritten. Hypothesen wie jene, dass Fraktalkin-induzierte Signalwege die Tau- und A β -Pathologie (mit womöglich divergenten Folgen) beeinflussen, sind weiterhin eine Triebfeder der AD-Forschung und werden – wie die oben aufgeführten Studien verdeutlichen – zumeist anhand transgener Mausmodelle validiert.

1.4 Demenzforschung anhand transgener Mausmodelle

Die Erforschung humaner neurodegenerativer Erkrankungen wird durch verschiedene Faktoren erschwert. So unterliegen Patientenstudien zahlreichen Restriktionen: Bereits die eindeutige Krankheitsdiagnose zu Lebzeiten scheitert oftmals aus Mangel an zuverlässigen, anwenderfreundlichen Biomarkern. Daher können viele Demenzerkrankungen noch immer erst postmortal eindeutig klassifiziert werden. Das dann ggf. erst viele Stunden nach Todeseintritt zur Verfügung stehende Gehirngewebe weist häufig sekundäre Schädigungen auf, welche einen negativen Einfluss auf biochemische Analysen haben können. Die daraus gewonnenen Daten liefern nur Informationen zum Gewebezustand beim Todeszeitpunkt, lassen jedoch keine Rückschlüsse auf Pathogenese und Ätiologie zu. Histologische Untersuchungen am lebenden Patienten sind nur in seltenen Fällen durch eine Biopsie möglich. Zum Treffen allgemeingültiger Aussagen müssen außerdem interindividuelle Unterschiede in beispielsweise Geschlecht, Alter, Lebensweise und Umfeld der Erkrankten berücksichtigt werden. An Studien teilnehmende Patientengruppen sind meist heterogen und weisen oftmals multiple Begleiterkrankungen auf. Da neben der Symptom-Bekämpfung bzw. der Reversion demenzieller Veränderungen die Krankheits-Prävention eines der Hauptziele der medizinischen Forschung darstellt, sollten zudem Patienten in einem möglichst frühen, präklinischen Stadium untersucht und vorbeugend behandelt werden (Sperling et al., 2012). Ein solcher Ansatz wird in prospektiven Langzeitstudien an Familienmitgliedern von Trägern autosomal-dominanter FAD-Mutationen verfolgt. Derartige internationale Studien wie DIAN (Dominantly Inherited Alzheimer Network; Morris et al., 2012) oder API (Alzheimer's Prevention Initiative; Reiman et al., 2011), sind langwierig und höchst aufwändig, auch da weltweit nur einige Hundert FAD-Familien bekannt sind.

Mit der Entwicklung genetisch veränderter Tiermodelle sowie hochspezifischer Untersuchungsmethoden wird der modernen Neurowissenschaft alternativ bzw. ergänzend zu Patientenstudien ein riesiges Potenzial an Forschungsmöglichkeiten eröffnet. Neben Fadenwürmern (z. B. *Caenorhabditis elegans*), Insekten (Taufliegen, *Drosophila melanogaster*) und Fischen (Zebrafärblingen, *Danio rerio*) zählen dabei Nagetiere wie Ratten (*Rattus norvegicus forma domestica*) und Mäuse (*Mus musculus*) zu den klassischen Modellorganismen. Durch die Entdeckung AD-typischer Ablagerungen und demenzieller Beeinträchtigungen in gealterten nicht-humanen Primaten (Price et al., 1991), Haushunden (*Canis lupus familiaris*; Cummings et al., 1993) und Strauchratten (*Octodon degus*; Ardiles et al., 2012) stehen außerdem natürliche, genetisch unveränderte AD-Tiermodelle zur Verfügung.

Eigenschaften wie die verhältnismäßig einfache Zucht und Haltung, die große Ähnlichkeit des murinen und humanen Genoms sowie die Verfügbarkeit von Hunderten genetisch veränderten Inzuchtlinien machen die Maus zum führenden Modellorganismus in der Demenzforschung (Götz und Ittner, 2008). Zur künstlichen Erzeugung FTD- oder AD-ähnlicher Symptome wird gezielt in die Erbinformation der Nagetiere eingegriffen: Dies geschieht z. B. durch das Einbringen von Transgenen, wie humanen *MAPT*-, *APP*-, oder *PSEN1*-Genen mit bekannten FTDP-17- bzw. FAD-Mutationen. Die Genexpression lässt sich dabei mittels Promotor-Auswahl eingrenzen und der resultierende Funktionsgewinn untersuchen. Eine Veränderung der endogenen Erbinformation wird ermöglicht durch das Erzeugen von (Punkt-, Deletions- oder Insertions-) Mutationen oder das Ersetzen durch ein Fremdgen (Gen Knockin). Außerdem können grundlegende Informationen über die Funktionsweise krankheitsrelevanter Proteine durch Entfernen des entsprechenden Gens gewonnen werden (Gen Knockout).

Heute gibt es viele Dutzende Tauopathie-Mausmodelle (Liste aktuell verfügbarer Linien: <http://www.alzforum.org/res/com/tra/>; Frank et al., 2008; LaFerla und Green, 2012). Diese exprimieren zumeist eine oder mehrere Isoformen des humanen Tau-Proteins in der Wildtyp-Form oder mit FTDP-17-Genmutationen – manche bei gleichzeitigem Knockout des murinen *Mapt*-Gens (mTau-Null-Hintergrund). In Kombination mit (mutierten) humanen *APP*- oder *PSEN1*-Transgenen entstehen AD-Mausmodelle, welche jedoch untereinander starke Abweichungen in Histopathologie und Symptomatik aufweisen können. Dafür sind nicht nur durch die verschiedenen pathogenen Eigenschaften der jeweiligen Transgene ursächlich; auch die Verwendung unterschiedlicher Promotoren (häufig: *Thy1*, *PrP*, *CaMK-II* oder *PDGF*) bedingt regionale und quantitative Differenzen in der Transgen-Expression, welche sich wiederum auf den Krankheitsverlauf auswirken. *APP*-/*PSEN1*-transgene Mäuse zeigen AD-typische Proteinablagerungen in Form von A β -Plaques und Amyloidangiopathie, sowie Abnahmen in der Synapsendichte und Verhaltensauffälligkeiten wie schlechtere Lern- und Gedächtnisleistungen – jedoch keine NFTs und höchstens einen minimalen Verlust von Nervenzellen (Zahs und Ashe, 2010). Daher werden sie von manchen Forschern auch als Modelle für die langjährige asymptomatische AD-Phase oder beschleunigte Gehirnalterung betrachtet (Ashe und Zahs, 2010). Erst durch das zusätzliche Einbringen von mutierten humanen *MAPT*-Transgenen werden neurodegenerative AD-Mausmodelle mit fibrillären Tau-Aggregaten und ausgeprägtem Neuronenverlust erzeugt. Bei der Verwendung derartiger Modelle gilt es jedoch zu beachten, dass sie zum einen die mit weniger als 10% aller AD-Fälle sehr seltenen erblichen FAD-Varianten nachbilden. Außerdem überexprimieren sie mutiertes humanes Tau-Protein, während bislang keine *MAPT*-Mutation in AD-Patienten detektiert wurde.

Die intra- und z. T. sogar interspezifische Übertragbarkeit vieler Proteinopathien sowie deren Ausbreitungseigenschaften innerhalb des Nervensystems ermöglichen Alternativen zur langwierigen Zucht und Alterung genetisch veränderter Mausmodelle: So wurde gezeigt, dass die direkte Injektion von synthetischen Tau-Fibrillen oder Gehirnlisat (FTDP-17-)*MAPT*-transgener bzw. (FAD-)*APP*-transgener Mäuse in das Gehirn anderer (Wildtyp-)*MAPT*-transgener Mäuse ohne NFT-Pathologie die Entstehung von fibrillären Tau-Ablagerungen hervorrufen bzw. beschleunigen kann, welche sich dann auch in benachbarte Gehirnregionen ausbreiten (Bolmont et al., 2007; Clavaguera et al., 2009; Iba et al., 2013). Weitergehend kann auch A β -enthaltender Gehirnextrakt von AD-Patienten durch intrazerebrale Injektion als Keim für A β -Pathologie in (FAD-)*APP*-transgenen Mäusen dienen (Meyer-Luehmann et al., 2006); und selbst intraperitoneal – also außerhalb des ZNS – eingebrachtes, A β -reiches Gehirnlisat kann in den Mäusen zerebrale β -Amyloidose verursachen (Eisele et al., 2010). Während die oben genannten Experimente durch exogene Keime erzeugte oder beschleunigte Tau- bzw. A β -Pathologie in transgenen Mäusen nachwiesen, können Injektionen synthetischer α -Synuclein-Fibrillen Parkinson-ähnliche Neurodegeneration sogar in Wildtyp-Mäusen hervorrufen (Luk et al., 2012).

Durch die hohe Kontrolle der Wissenschaftler über Faktoren wie Alter, Geschlecht, Verwandtschaftsgrad und einheitliche Haltungsbedingungen der Mäuse sind oftmals – im Vergleich zu Patientenstudien – relativ geringe Kohortengrößen ausreichend um beispielsweise Medikamente zur Entwicklung neuer Therapien auszutesten. Beim Forschungsdesign und der Interpretation derartiger erzeugter Datensätze müssen jedoch wichtige Grundsätze beachtet werden, um Fehlaussagen zu vermeiden (Jucker, 2010): So sollten in randomisierten, kontrollierten Studien Kohorten gleichen Geschlechts und genetischen Hintergrunds mit überwachtem Gesundheitsstatus untersucht werden. Die Daten-Auswertung sollte verblindet erfolgen und Signifikanzen mit adäquaten statistischen Tests überprüft werden. Die externe Gültigkeit der Ergebnisse, also die Übertragbarkeit der Mausmodell-Studien in die klinische Forschung, wird verbessert durch Einbezug mehrerer, möglichst unterschiedlicher transgener Mausmodelle, um linienspezifische Effekte auszuschließen. Dabei kann die Aussagekraft des Modells nicht über dessen begrenzte artifizielle Repräsentation der zu untersuchenden Erkrankung hinausreichen. Deshalb sollte stets die klinische Relevanz der Messparameter und die objektive Herangehensweise hinterfragt werden, auch um ggf. Hypothesen-getriebene Missinterpretationen zu vermeiden. Eine direkte Anwendung der Mausmodell-Ergebnisse auf den Menschen ist höchstens mit starken Einschränkungen möglich – ein genereller Nachteil der Forschung an Modellorganismen.

1.5 Synapsen: Verbindungselemente und Gedächtniskorrelat

Im menschlichen Gehirn bilden schätzungsweise 10^{12} hochspezialisierte Nervenzellen (Neuronen) ein komplexes Netzwerk. Abgesehen von wenigen Ausnahmen in den neurogenen Nischen entstehen sie bereits pränatal und haben eine längere Lebensdauer als alle anderen Körperzellen. Ein Neuron kann tausende Synapsen (von gr.: syn = zusammen, haptein = tasten, greifen) ausbilden, durch welche es mit anderen Nervenzellen verbunden ist. Die Gesamtzahl aller menschlichen Synapsen wird auf 10^{15} geschätzt. Auch das um mehrere Größenordnungen kleinere Mausgehirn beherbergt noch ca. 10^9 Neuronen und 10^{11} Synapsen.

1.5.1 Dendritische Spines: exzitatorische postsynaptische Spezialisierungen

Die Mehrzahl der neuronalen Kontaktstellen sind chemische Synapsen. Sie ermöglichen eine Übertragung der als elektrische Impulse (Aktionspotentiale) intraneuronal weitergeleiteten Signale an benachbarte Zellen in Form biochemischer Botenstoffe, der Neurotransmitter. Chemische Synapsen bestehen aus einer (meist axonalen) prä- und einer (meist dendritischen) postsynaptischen Spezialisierung. Im Falle exzitatorischer Synapsen, welche eine erregende Wirkung auf die Zielzelle ausüben, bezeichnet man diese als axonale Boutons (fr.: bouton = Knopf) und dendritische Dornenfortsätze oder Spines (engl.: spine = Dorn, Stachel; **Abb. 6**).

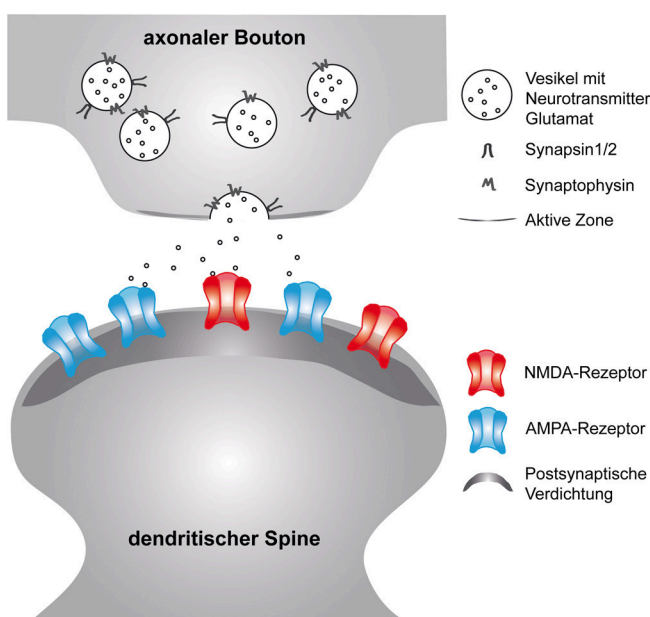


Abb. 6: Signalübertragung mittels exzitatorischer Synapsen

Die Ankunft eines Aktionspotentials löst im präsynaptischen axonalen Bouton den Einstrom extrazellulärer Kalziumionen durch spannungsgesteuerte Kanäle aus. Dies bewirkt wiederum in der sogenannten aktiven Zone das Verschmelzen synaptischer Vesikel mit der Zellmembran und somit die Freisetzung des Neurotransmitters Glutamat in den synaptischen Spalt. Vesikelmembranproteinen wie Synapsin1/2 oder Synaptophysin wird eine regulatorische Rolle in diesem exozytotischen Prozess zugeschrieben. Der Botenstoff Glutamat bindet an spezifische NMDA- (N-Methyl-D-Aspartat) oder AMPA- (engl.: α -amino-3-hydroxy - 5- methyl - 4- isoxazolepropionic acid) Rezeptoren auf der Oberfläche des postsynaptischen dendritischen Spine.

Diese Rezeptoren bilden zusammen mit Strukturproteinen (z. B. PSD-95), Adhäsionsproteinen und Enzymen ein enges Netzwerk, die elektronenmikroskopisch als dunkles Band hervortretende postsynaptische Verdichtung (engl.: postsynaptic density, PSD). Auf die Glutamat-Bindung erfolgt eine temporäre Öffnung Rezeptor-assoziiierter Ionenkanäle, was zu einer lokalen Depolarisation der Zellmembran führt. Dieses exzitatorische postsynaptische Potential (EPSP) trägt zur Auslösung eines Aktionspotentials bei und ermöglicht somit die Reizweiterleitung im postsynaptischen Neuron (nach Ho et al., 2011).

Dendritische Spines wurden erstmalig 1888 durch den spanischen Arzt Ramón y Cajal beschrieben, der bereits die kontaktbildende Funktion dieser 0,5-2 µm langen dornenförmigen Membranausstülpungen neuronaler Dendriten postulierte (Ramón y Cajal, 1888). Die meisten Spines bestehen aus einem kugelförmigen „Kopf“, welcher über einen dünneren „Hals“ mit dem Dendritenschaft verbunden ist (**Abb. 7**). Morphologische Parameter wie das Kopfvolumen oder die Halslänge ermöglichen eine Klassifizierung dendritischer Spines (Peters und Kaiserman-Abramof, 1970; Harris et al., 1992; **Abb. 7**): Stubby Spines sind halslos, kurz und stummelförmig (engl.: stubby). Der kleine Kopf der thin Spines sitzt auf einem langen, dünnen (engl.: thin) Hals. Mushroom Spines, deren schmaler Hals einen voluminösen kugeligen Kopf trägt, sehen einem Pilz (engl.: mushroom) ähnlich. Zudem können lange, fadenförmige Membranfortsätze gefunden werden, sogenannte Filopodien (von lat.: filum = Faden, pes = Fuß). Diese werden als Vorstufen funktioneller Spines angesehen und haben zumeist keinen präsynaptischen Gegenpart. Es gibt zahlreiche Zwischenstufen und Ausnahmen dieser klassischen Spine-Formen, wie beispielsweise sehr große kelchähnliche Spines oder mehrere von einem gemeinsamen Hals abgehende Spineköpfe, was eine eindeutige Kategorisierung oftmals erschwert.

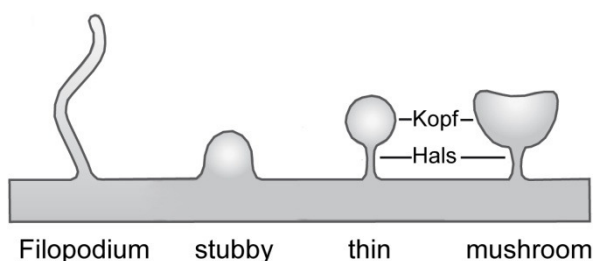


Abb. 7: Morphologie dendritischer Spines

Entsprechend der am weitesten verbreiteten Klassifizierung können dendritische Spines anhand morphologischer Charakteristika in stubby, thin oder mushroom Spines sowie Filopodien kategorisiert werden. Häufig finden sich entlang eines Dendriten verschiedene Spine-Formen in unmittelbarer Nachbarschaft (modifiziert nach Rochefort und Konnerth, 2012).

1.5.2 Strukturelle Plastizität dendritischer Spines

Synapsen sind keine starren Verbindungsglieder in unveränderlichen neuronalen Netzwerken, sondern bilden vielmehr durch ihr hohes Maß an struktureller Plastizität die physiologische Grundlage für Lern- und Gedächtnisleistungen (Ho et al., 2011). Durch vielfältige qualitative und/oder quantitative Modifikationen können Verbindungen zwischen Neuronen aktivitätsabhängig verstärkt oder abgeschwächt werden (Hebbsche Lernregel; Hebb, 1949). Dabei ist nicht nur die absolute Anzahl synaptischer Verbindungen variabel, sodass die Architektur des gesamten Netzwerks durch Kontaktaufnahme neuer prä- bzw. postsynaptischer Partner verändert werden kann. Vielmehr erlauben molekulare Mechanismen eine permanente adaptive Remodellierung bestehender Synapsen (Caroni et al., 2012):

Auf präsynaptischer Seite kann die Wahrscheinlichkeit der Neurotransmitter-Ausschüttung beeinflusst werden – beispielsweise durch Regulierung des Pools freisetzbarer synaptischer Vesikel, der Vesikel-Mobilität, des Exozytosemechanismus und des anschließenden Vesikel-Recyclings. Auch der enzymatische Neurotransmitter-Abbau im synaptischen Spalt sowie das dortige Netzwerk überbrückender Zelladhäsionsmoleküle bieten Modulationsmöglichkeiten. Die postsynaptische Signalgewichtung geschieht z. B. auf Ebene der relativen oder absoluten AMPA-/NMDA-Rezeptordichte sowie durch die Modifikation gekoppelter Signalwege. Derartige postsynaptische Anpassungen können sich direkt auf die Form dendritischer Spines auswirken, weshalb deren morphologische Analyse auch funktionelle Aussagen über die synaptische Verbindung erlaubt:

Während früher fälschlicher Weise angenommen wurde, dass die Form der Spines bei ihrer Entstehung pränatal festgelegt wurde, weiß man nun, dass sich diese vielmehr im Laufe der Entwicklung, aber auch im adulten Gehirn innerhalb von Minuten stark ändern kann bis hin zum kompletten Verschwinden oder Neuentstehen der Membranausstülpungen. Daher ist neben der morphologischen Spine-Klassifizierung auch eine auf ihrer Lebensdauer basierende Unterteilung möglich: Transiente Spines existieren per Konvention weniger als 8 Tage; über diesen Zeitraum hinaus stabile Spines werden als persistent bezeichnet (Holtmaat et al., 2005). Elektronenmikroskopische Studien zeigen, dass persistente Spines anders als die kurzlebigeren Membranausstülpungen meist in Verbindung mit einem präsynaptischen Bouton stehen und somit funktionelle Synapsen ausbilden (Knott et al., 2006). Der Entstehung neuer Synapsen geht das Auswachsen dendritischer Spines voraus, welche vorzugsweise bereits existierende Boutons anderer Synapsen kontaktieren (Knott et al., 2006). Andauernde synaptische Verstärkung, z. B. in Form einer Langzeit-Potenzierung (engl.: long-term potential, LTP), kann Spine-Wachstum induzieren; Langzeit-Depression

(engl.: long-term depression, LTD) hingegen bewirkt ein Schrumpfen bis hin zum kompletten Verlust dendritischer Spines (Engert und Bonhoeffer, 1999; Okamoto et al., 2004). Das Kopfvolumen persistenter Spines spiegelt somit die Stärke der synaptischen Verbindung wider, wobei es direkt mit der (AMPA-) Glutamatrezeptordichte korreliert (Matsuzaki et al., 2001). Bei diesen zumeist mushroom-förmigen Spines bewirkt der dünne Hals eine biochemische Kompartimentierung der Postsynapse, d. h. eine (wenn auch unvollständige) räumliche Abtrennung des Spinekopfs vom Dendritenschaft. Das ermöglicht die Feinabstimmung einzelner synaptischer Kontakte, beispielsweise durch lokale Synthese PSD-assoziiierter Proteine, Proteinabbau und Endo-/Exozytose, aber auch durch elektrische Isolierung und das Filtern synaptischer Potenziale – weitestgehend unabhängig von der Aktivität direkt benachbarter dendritischer Spines (Yuste, 2011).

Wichtige Rollen in der extrazellulären Regulierung der Spine-Dynamik werden Astrozyten und Mikrogliazellen zugeordnet: Meist sind dendritische Spines zumindest teilweise von Ausläufern der Astrozyten umgeben. Diese Gliazellen, welche fast die Hälfte der Gehirnzellen ausmachen, beeinflussen dabei aktiv die strukturelle und funktionelle Plastizität der Synapsen (Ullian et al., 2004). Mikrogliazellen hingegen tasten mit ihren motilen Fortsätzen permanent ihre Umgebung ab und nehmen so auch direkten Kontakt mit dendritischen Spines auf. Im Falle einer synaptischen Dysfunktion können sie diese in einem als „Stripping“ bezeichneten Prozess beseitigen (Kettenmann et al., 2013).

Dendritische Spines tragen zur Erhöhung der synaptischen Konnektivität von Nervenzellen bei und ermöglichen dabei eine lineare Integration der einzelnen Signaleingänge sowie adaptive Plastizitätsmechanismen (Yuste, 2011). Sowohl die Spine-Umsatzraten als auch ihre Formen stehen in einem direkten Zusammenhang mit dem erfolgreichen Erlernen und Erinnern neuer Aufgaben (Fu und Zuo, 2011). Morphologische Veränderungen dendritischer Spines ereignen sich aber nicht nur im Zusammenhang mit Lernprozessen, sondern auch unter pathologischen Bedingungen, wie den neurodegenerativen Erkrankungen (Tackenberg et al., 2009), wo sie zu erheblichen funktionellen Beeinträchtigungen führen können. Voraussetzung für die Entdeckung und weitergehende Erforschung der synaptischen Plastizität war u. a. die Entwicklung moderner Techniken wie der Zwei-Photonen-Laserscanningmikroskopie, welche hochauflösende intravitalmikroskopische Analysen ermöglicht.

1.6 Hochauflösende Mikroskopietechniken

In der vorliegenden Dissertation wurde zur Beantwortung neurobiologischer Fragestellungen von unterschiedlichen Mikroskopietechniken in Kombination mit immunologischen und gentechnischen Methoden Gebrauch gemacht. So wurden ex vivo, am fixierten Gehirngewebe von transgenen Mausmodellen neurodegenerativer Erkrankungen, pathologische Veränderungen in den Größenordnungen von 10^{-5} m (amyloide Plaques, Neuronenverlust) und 10^{-6} m (Synapsendichten) bis in den Nanometerbereich (ultrastrukturelle Pathologie) mittels konventioneller Lichtmikroskopie, konfokaler Laserscanningmikroskopie und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) untersucht. Außerdem wurden Intravitaldaten zur Morphologie und Kinetik postsynaptischer Spezialisierungen (dendritischer Spines) durch Zwei-Photonen-Laserscanningmikroskopie erhoben.

Die gegenüber konventionellen nicht-konfokalen Lichtmikroskopiemethoden erhöhte Auflösungskraft der konfokalen Laserscanningmikroskopie (Minsky, 1961) beruht auf der Anfertigung optischer Schnitte. Dabei werden Fluorophore in einer Probe durch einen Laserstrahl selektiv und räumlich begrenzt stimuliert (Ein-Photon-Anregung, **Abb. 8A-B**). Verwendung als Fluorophore finden beispielsweise fluoreszierende Proteine (hier: das gelb fluoreszierende Transgen-Produkt YFP, engl.: yellow fluorescent protein), spezifisch bindende Farbstoffe (hier: Amyloid-bindendes Methoxy-X04) oder Antikörper-gekoppelte Farbstoffe (hier: Alexa-Sekundärantikörper-Konjugate). Der Laserstrahl wird über das Objekt gerastert, sodass einzelne Bildpunkte nacheinander angeregt werden. Die emittierte Fluoreszenz wird durch eine Lochblende detektiert, welche Licht von außerhalb der Fokusebene blockiert. Somit können zelluläre Strukturen im Submikrometerbereich aufgelöst werden. Zur Erhöhung der Aufnahmegeschwindigkeit werden Linienscanner verwendet, die komplette Bildzeilen auf einmal erfassen.

Eine weitere Herabsetzung der Auflösungsgrenze (auf bis zu 0,05 nm) bietet die TEM (Knoll und Ruska, 1932). Dabei wird die Probe mit Elektronen durchstrahlt, welche zuvor durch Magnetfelder gebündelt und fokussiert wurden, ähnlich Lichtstrahlen durch optische Linsen. In der Probe werden die Elektronen unterschiedlich gestreut – besonders stark, wenn sie auf Atome mit hoher Ordnungszahl treffen. Abgelenkte Elektronen werden mit einer Objektiv- bzw. Kontrastblende zurückgehalten. Der resultierende Massendickenkontrast ermöglicht beispielsweise ein Negativbild zellulärer Membranen. Voraussetzung für Gewebeuntersuchungen mittels TEM sind eine aufwendige Proben-Fixierung, -Einbettung und -Sektionierung (hier: Ultradünnschnitte von ca. 70 nm Dicke). Zur Negativkontrastierung werden lipophile Reagenzien wie Osmiumtetroxid oder Uranylacetat eingesetzt. Für

immunhistochemische Proteinnachweise eignen sich Sekundärantikörper im Konjugat mit kolloidalem Gold oder mit Peroxidase, durch deren enzymatische Aktivität DAB (3,3'-Diaminobenzidin) oxidiert wird und lokal ein elektronendichtes Präzipitat bildet. Auf diesem Prozess basieren auch neueste technische Entwicklungen wie die genetisch kodierten Reporter miniSOG, APEX oder TimeSTAMP (Butko et al., 2012; Martell et al., 2012; Shu et al., 2011), welche außerdem – durch Eigenfluoreszenz oder in Fusion mit Fluorophoren – die Korrelation von Licht- und Elektronenmikroskopie erleichtern.

Bei hochauflösenden Untersuchungen biologischer Vorgänge in komplexen Systemen wie dem murinen Gehirn stoßen Verfahren wie die TEM-Analyse jedoch auf methodische Limitierungen. Sie gewähren nur Einblicke in den Zustand eines sehr begrenzten Gewebeausschnitts zu einem singulären Moment, dem Todeszeitpunkt des Gewebespenders. Die chronische Intravitalmikroskopie hingegen ermöglicht das Verfolgen physiologischer und pathologischer Prozesse im lebenden Modellorganismus über einen längeren Zeitraum. Grundlage dafür ist die Zwei-Photonen-Laserscanningmikroskopie (Denk et al., 1990; **Abb. 8C**). Hierbei erfolgt die Anregung des Fluorophors mittels quasi-simultaner Stimulation durch zwei Photonen aus dem nah-infraroten Wellenlängenbereich statt durch ein höher-energetisches Photon (**Abb. 8A**). Unter diesen nichtlinearen Absorptionsbedingungen steigt die Anregungswahrscheinlichkeit proportional zum Quadrat der Lichtintensität und sinkt mit der vierten Potenz des Fokusabstands. Daher werden nur Fluorophore in der Fokusebene angeregt (**Abb. 8B**), was im Vergleich zur Ein-Photon-Mikroskopie die Streuung der stimulierten Emission stark reduziert. Durch den niedrigeren erforderlichen Anregungsenergiebetrag werden Gewebeschäden durch Phototoxizität oder ein Ausbleichen der Probe verhindert. Die Verwendung langwelliger, nah-infraroten Lichts minimiert zudem dessen Absorption und Streuung im Gewebe, weshalb hohe Eindringtiefen ermöglicht werden. Somit können beispielsweise im Hirngewebe von Mausmodellen fluoreszenzmarkierte Strukturen (hier: YFP-exprimierende Neuronen und Methoxy-X04-gefärbte amyloide Plaques) in Darstellungstiefen von bis zu 700 µm repetitiv intravitalmikroskopisch erfasst werden.

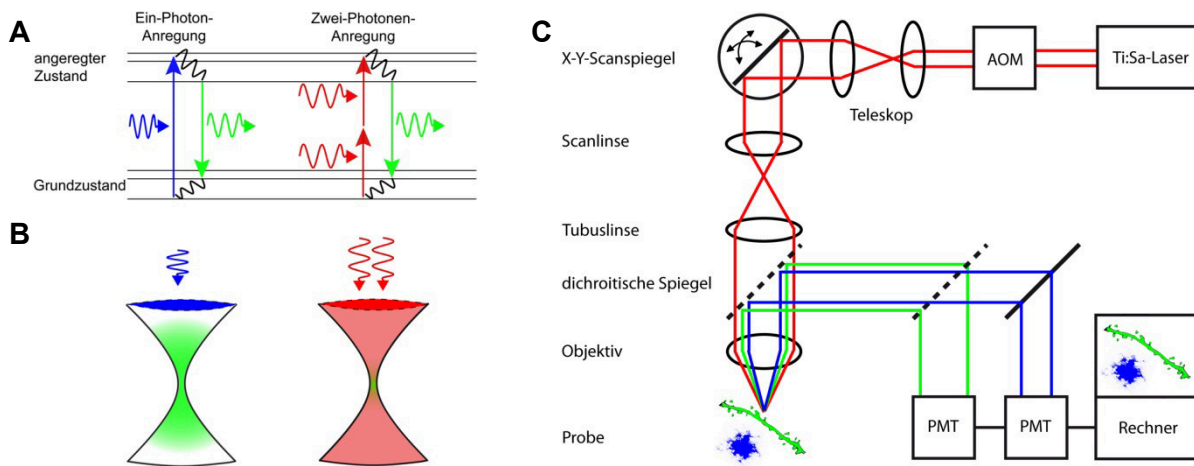


Abb. 8: Prinzipien der Ein- und Zwei-Photonen Mikroskopie

A, Jablonski Energielevel-Diagramm zur Veranschaulichung der linearen Ein-Photon- (blau) und nicht-linearen Zwei-Photonen-Anregung (rot) eines Fluorophors. Dargestellt sind die möglichen Übergänge von Valenzelektronen aus ihrem Grundzustand in energetisch höhere Anregungszustände (Orbitale) nach Lichtadsorption. Die Relaxation in den Grundzustand kann durch strahlungslose Desaktivierung oder aber durch Lichtemission, wie hier in Form von Fluoreszenz (grün), erfolgen. Strahlungsfreie Übergänge sind in schwarz dargestellt. **B,** Schematische Darstellung der stimulierten Fluoreszenz-Emission (grün) innerhalb einer Probe, welche sich bei konfokaler Ein-Photon-Anregung (blau) entlang des nahezu kompletten Strahlenkegels erstreckt (links), bei Zwei-Photonen-Anregung (rot) jedoch auf den Fokuspunkt beschränkt ist (rechts; nach Helmchen und Denk, 2005). **C,** Vereinfachter Aufbau eines Zwei-Photonen-Laserscanningmikroskops. Als Anregungsquelle dient ein Titanium-Saphir(Ti:Sa)-Laser, welcher Photonenpulse (rot) im Femtosekundentakt erzeugt und dabei über einen Wellenlängenbereich von ca. 700-1000 nm durchstimmbar ist. Die Regulierung der Lichtintensität erfolgt mit Hilfe eines akustooptischen Modulators (AOM), dem ein Teleskop zur Strahlaufweitung nachgeschaltet wird. Ein System aus X-Y-Scanspiegel, Scanlinse, Tubuslinse und Objektiv führt den fokussierten Laserstrahl rasterförmig über die Probe. Die stimulierte Fluoreszenz-Emission (blau bzw. grün) wird mit dichroitischen Spiegeln nach Wellenlänge getrennt. Fotoelektronenvervielfacher (PMT, engl.: photomultiplier tube) wandeln die eintreffenden Photonen in ein verstärktes elektrisches Signal um, welches schließlich zu einer Probenabbildung verrechnet wird (nach Svoboda und Yasuda, 2006).

1.7 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit sollte zu einem besseren Verständnis der grundlegenden pathologischen Prozesse beitragen, welche bei neurodegenerativen Erkrankungen wie den Tauopathien zum Untergang von Synapsen und Nervenzellen führen. Besonderes Augenmerk lag dabei auf den Auswirkungen der Tau-Pathologie auf die strukturelle Plastizität dendritischer Spines. Verschiedene transgene Mauslinien (Tau P301S, Tau x APP PS1 und 3xTg-AD) dienten als Modelle Frontotemporaler Demenz / FTDP-17 sowie der AD. Das zusätzliche Einbringen eines fluoreszierenden, neuronal exprimierten Transgens (*YFP*) ermöglichte intravitalmikroskopische Langzeituntersuchungen kortikaler dendritischer Spines mittels der Zwei-Photonen-Laserscanningmikroskopie.

Zunächst sollten in Tau P301S Mäusen die Effekte FTDP-17 mutierten Tau-Proteins auf Spine-Dichte, -Kinetik und -Morphologie untersucht werden und ggf. mit pathologischen intrazellulären Tau-Ansammlungen korreliert werden. Ergänzende immunhistochemische Synapsendichte-Analysen an Gehirnschnitten der Tiere sollten zudem Informationen über mögliche präsynaptische Schädigungen liefern.

Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese der AD suggeriert synergistische Effekte von A β - und Tau-Pathologie. In der Mauslinie Tau x APP PS1, welche im Rahmen dieser Arbeit neu generiert wurde, konnten reine Tau-abhängige Effekte von durch zusätzliche A β -Pathologie hervorgerufenen Veränderungen unterschieden werden. Anhand dieses Modells sollte eine kritische Überprüfung der Amyloid-Kaskaden-Hypothese erfolgen. In diese sollten neben potenziellen Beeinträchtigungen der strukturellen Plastizität dendritischer Spines auch AD-typische histologische Läsionen wie amyloide A β -Plaques, neuritische Dystrophien und Phospho-Tau Ablagerungen einbezogen werden. Zusätzlich sollte eine elektronenmikroskopische Analyse Aufschluss über die Ultrastruktur neuritischer Dystrophien im 3xTg-AD-Mausmodell geben.

Neurodegenerative Erkrankungen werden zumeist von inflammatorischen Prozessen begleitet. Daher hatte eine separate Pilotstudie zum Ziel, die Rolle von Mikrogliazellen in Tauopathien zu untersuchen. Hierzu wurde ein weiteres Mausmodell erzeugt (Tau x CXCR), in welchem durch genetische Fraktalkinrezeptor-Reduktion die Kommunikation zwischen Neuronen und Mikrogliazellen modifiziert werden konnte. Welche Effekte die resultierende Überaktivierung der Mikrogliazellen auf die kortikale Tau-Pathologie hat, sollten immunhistologische Dichtemessungen Phospho-Tau enthaltender Zellen zeigen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Transgene Mauslinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden fünf verschiedene transgene Mauslinien verwendet: Zur Modellierung humaner neurodegenerativer Erkrankungen – Frontotemporaler Demenz bzw. der AD – dienten die Linien Tau P301S, APP PS1 und 3xTg-AD. Die intravitalmikroskopische Untersuchung kortikaler Nervenzellen wurde ermöglicht durch Verpaarungen dieser Mäuse mit der Linie YFP-H. Um die Rolle des Fraktalkin-Rezeptors in Tauopathien zu analysieren, fand die Mauslinie CXCR Verwendung. Die Linie Tau P301S wurde von Prof. Dr. Michel Goedert (Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK) bereitgestellt. Alle weiteren Linien (APP PS1, 3xTg-AD, YFP-H und CXCR) wurden über The Jackson Laboratory (Maine, USA) bezogen.

Die Mäuse wurden in der zentralen Tierhaltungseinrichtung des Zentrums für Neuropathologie und Prionforschung der LMU München unter spezifiziert pathogenfreien (SPF) Bedingungen bei einem 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus verpaart und gehalten. Gleichgeschlechtigen Gruppen von höchstens 6 Tieren pro individuell ventiliertem Käfig (engl.: individually ventilated cage, IVC) standen dabei Futter und Wasser ad libitum zur Verfügung. Alle experimentellen Arbeitsschritte wurden in Übereinstimmung mit einem durch die LMU München und die Regierung von Oberbayern genehmigten Tierversuchsprotokoll durchgeführt (Referenznummer 55.2-1.54-2531-110-06).

2.1.1 Tau P301S

Das Tauopathie-Mausmodell Tau P301S exprimiert ein humanes Transgen für die kürzeste 4-Repeat Tau-Isoform (383 Aminosäuren Länge, 40 kDa Molekulargewicht) mit der FTDP-17 Mutation P301S (Allen et al., 2002). Patienten, welche Träger dieser Genmutation sind, leiden unter früh einsetzender, schnell fortschreitender frontotemporaler Demenz und Parkinsonismus sowie epileptischen Anfällen (Sperfeld et al., 1999). Die Mäuse wurden auf dem genetischen Hintergrund der Linie C57BL/6J x CBA/ca erzeugt und zur Linienetablierung mit C57BL/6J-Mäusen verpaart. Die Regulierung der Genexpression erfolgt durch einen modifizierten *Thy1*-Promotor (Vidal et al., 1990), den *Thy1.2*-Promotor (Kelley et al., 1994). Das Zelloberflächen-Glykoprotein Thy1 wird in ZNS-Neuronen sowie einigen weiteren Geweben und Zelltypen exprimiert (Caroni, 1997). Bereits im Alter von fünf Monaten zeigen homozygote Tau P301S-Mäuse zahlreiche intraneuronale Ablagerungen

von hyperphosphoryliertem Tau-Protein im Gehirn und Rückenmark, begleitet von einem altersabhängigen, schichtspezifischen Verlust kortikaler Neuronen (Allen et al., 2002; Delobel et al., 2008; Hampton et al., 2010; Velasco et al., 2008). Schon lange vor histologischen Veränderungen können Verhaltensauffälligkeiten wie Hyperaktivität und verstärktes Explorationsverhalten gemessen werden (Scattoni et al., 2010). Der ausgeprägte Motorphänotyp wird dominiert von Muskelschwäche, Tremor und Hinterlauf-Paraparese, was auf das Absterben der Hälfte aller Rückenmarks-Motoneuronen zurückzuführen ist. Ein ähnlicher Phänotyp entwickelt sich bei heterozygoten Tieren erst deutlich später, im Alter von 12 bis 14 Monaten.

Für intravitalmikroskopische Untersuchungen wurden homozygote Tau P301S-Mäuse mit der Linie YFP-H verpaart (Linien-Kurzname Tau x YFP) und die F1-Nachkommen wiederum untereinander verpaart. Zur Homozygotie-Bestimmung *MAPT*-transgener Tiere wurde eine quantitative Echtzeit-PCR (q-PCR) durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.3). Um *YFP*-exprimierende Tau-homozygote, -heterozygote und Wildtyp-Mäuse zu erhalten wurden dann (jeweils *YFP*-transgene) Tau-homozygote untereinander verpaart sowie Tau-heterozygote mit Nicht-Transgenen.

2.1.2 APP PS1

In das Genom des AD-Mausmodells B6.Cg-Tg(APP^{swe},PSEN1^{dE9})85Dbo/J (kurz: APP PS1) wurde ein doppeltes Transgen für Proteine mit bekannten FAD-Mutationen durch Vektor-Koinjektion an einen einzigen Chromosomenloкус inseriert (Jankowsky et al. 2001). So exprimieren diese Tiere chimäres humanes/murines APP (695 Aminosäuren Isoform) mit der schwedischen FAD-Doppelmutation K595N/M596L (APP^{swe}) und humanes Präsenilin 1 mit einer Deletion des neunten Exons (PS1^{ΔE9}). Die Mauslinie wurde auf dem genetischen Hintergrund der Linie C57BL/6 x C3H gezüchtet. Kontrolliert durch den murinen *Prion*-Promotor erfolgt die Transgen-Expression hauptsächlich in ZNS-Neuronen. Dies führt zu einer Verschiebung des Aβ₄₂:Aβ₄₀-Expressionsquotienten zugunsten des längeren, leichter aggregierenden Peptids. Aβ-Ablagerungen im Gehirn können bereits ab einem Alter von vier bis sechs Monaten gefunden werden, korrelierend mit dem Auftreten erster Lerndefizite (Garcia-Alloza et al., 2006; Jankowsky et al., 2004; Park et al., 2006; Phillips et al., 2011). In diesem Alter bekommt jedes zweite Tier epileptische Anfälle (Minkeviciene et al., 2009). Einjährige Tiere zeigen zahlreiche Plaques im Hippocampus und Neokortex sowie cerebrale Amyloidangiopathie, eine verminderte kortikale Synapsendichte und starke Beeinträchtigungen im optischen räumlichen Lernen und Gedächtnis (Garcia-Alloza et al., 2006; Gimbel et al., 2010; Jankowsky et al., 2004; Phillips et al., 2011).

Zur Erzeugung eines AD-Mausmodells mit A β - und Tau-Pathologie wurden APP PS1-Mäuse mit der Linie YFP-H verpaart und transgene Nachkommen mit homozygoten Tau P301S-Mäusen verpaart, welche ebenfalls das *YFP*-Transgen trugen. Die hieraus resultierende Linie wird im Folgenden mit Tau x APP PS1 x YFP oder Tau x APP PS1 bezeichnet, wobei alle Transgene heterozygot vorliegen.

2.1.3 3xTg-AD

Das AD-Mausmodell C57BL/6-Psen1^{tm1Mpm}Tg(APP^{swe},tauP301L)1Lfa/J (kurz: 3xTg-AD) trägt zwei mutierte humane Transgene, *APP* (695 Aminosäuren Isoform) mit der schwedischen FAD-Doppelmutation K670N/M671L und *MAPT* (383 Aminosäuren Isoform) mit der FTDP-17 Mutation P301L, sowie eine Knockin-Mutation des *PSEN1*-Gens, M146V (Oddo et al., 2003a). Dazu wurden cDNS der *APP*- und *MAPT*-Transgene jeweils in *Thy1.2*-Expressionskassetten subkloniert und die beiden Konstrukte wiederum gleichzeitig in Pronuklei von Einzelzell-Embryonen der homozygoten PS1_{M164V} Knockin-Mauslinie mikroinjiziert. Die Transgen-Expression ist begrenzt auf das ZNS, insbesondere den Hippocampus und zerebralen Kortex. Die Mäuse wurden auf einem C57BL/6 x 129sv Hintergrund gezüchtet. Sie entwickeln progressive A β - und Tau-Pathologie in einem zeitlich und räumlich spezifischen Muster, das eine große Ähnlichkeit mit dem von AD-Patienten aufweist. So manifestieren sich kognitive Beeinträchtigungen wie synaptische Plastizitätsdefizite noch vor der Entstehung von Plaques oder Tangles und korrelieren vielmehr mit dem Auftreten intrazellulärer A β -Oligomere ab einem Alter von 4 Monaten (Oddo et al., 2003b, 2006). Einjährige Mäuse zeigen erste Tau-Aggregate im Hippocampus und Kortex, wo dann bereits zahlreiche extrazelluläre A β -Plaques zu finden sind (Oddo et al., 2003a und 2003b).

3xTg-AD-Mäuse wurden mit der Linie YFP-H verpaart (Linien-Kurzname 3xTg-AD x YFP) und homozygot für die drei mutanten Allele gezüchtet, wobei zur Homozygotie-Bestimmung eine q-PCR durchgeführt wurde.

2.1.4 YFP-H

Die Mauslinie B6.Cg-Tg(Thy1-YFPH)2Jrs/J (kurz: YFP-H; Feng et al. 2000) trägt ein Transgen für YFP, ein Derivat des grün fluoreszierenden Proteins GFP, welches aus der Alge *Aequorea victoria* gewonnen wurde (Ormö et al., 1996). Die Mäusezucht erfolgte auf dem genetischen Hintergrund der Linie C57BL/6J x CBA. Die Expression des Transgens wird – wie auch in den Linien Tau P301S und 3xTg-AD (siehe Kapitel 2.1.1) – durch den

Thy1.2-Promotor reguliert. YFP-exprimierende Neuronen sind besonders zahlreich in Ganglienzellen des Rückenmarks und Moosfasern des Kleinhirns; aber auch im Hippocampus und den für die Intravitalmikroskopie zugängigen neokortikalen Schichten V und – seltener – II/III wird das Protein von einigen Nervenzellen gebildet (Feng et al., 2000). Spezifische Anregung des Fluorophors mittels Laserlicht ermöglicht eine mikroskopische Visualisierung dieser Neuronen *in vivo* (siehe Kapitel 2.3.2). Durch Diffusion gelangt das lösliche zytoplasmatische Protein in verschiedene Zellkompartimente, weshalb hochauflösende Morphologiestudien der Somata und Neuriten bis hin zu einzelnen dendritischen Spines durchgeführt werden können.

2.1.5 CXCR

Morphologische und funktionelle Untersuchungen von Mikrogliazellen ermöglicht die Mauslinie B6.129P-Cx3cr1^{tm1Litt}/J (kurz: CXCR; Jung et al. 2000): Mittels Insertion des Gens für EGFP (engl.: enhanced green fluorescent protein; verstärktes grün fluoreszierendes Protein) am Genlokus des Fraktalkinrezeptors CX₃CR1 wurde ein Knockout des Rezeptors generiert mit gleichzeitiger Markierung der betroffenen Zellen durch die Fluorophor-Expression. Da der Fraktalkinrezeptor im Gehirn fast ausschließlich von Mikrogliazellen exprimiert wird (Harrison et al., 1998), werden diese somit selektiv markiert. Außerdem exprimieren weitere Zellen des Immunsystems wie Monozyten, dendritische Zellen und natürliche Killerzellen des Transgens. Homozygote CXCR-Mäuse (d. h. *Cx3cr1*-Knockout-Mäuse) zeigen keine Auffälligkeiten in Physiologie oder Verhalten. Die Tiere wurden auf C57BL/6-Hintergrund gezüchtet.

Zur Untersuchung des Einflusses der Fraktalkinrezeptor-Expression auf die Tau-Pathologie wurden homozygote CXCR-Mäuse mit Tau-homozygoten Tau x YFP-Mäusen verpaart (Linien-Kurzname Tau x CXCR). Die F1-Nachkommen wurden wiederum untereinander verpaart und Tau-homozygote Mäuse mittels q-PCR ermittelt. Somit konnten Tau-homozygote und -heterozygote Mäuse mit normaler, verminderter oder vollständig fehlender Fraktalkinrezeptor-Expression untereinander verglichen werden.

2.2 Maus-Genotypisierung

Für die Identifizierung transgener Tiere wurden den gezüchteten Mäusen im Alter von ca. 3 Wochen, nach Trennung vom Muttertier, Schwanzbiopsien entnommen und zur Markierung Ohrlöcher bzw. -kerben gestanzt. Außerdem wurden als zusätzliche Absicherung während der Operation zum Einbau eines kortikalen Fensters (Kapitel 2.3.1) Fellproben gesammelt bzw. alternativ weitere Schwanzbiopsien nach der transkardialen Perfusion geschnitten (Kapitel 2.4.1). Aus diesen Gewebeproben wurde genomische DNS aufgereinigt (Kapitel 2.2.1) und mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR; Saiki et al., 1988) die jeweiligen Transgene bzw. endogenen Kontrollgene amplifiziert (Kapitel 2.2.2). Nach elektrophoretischer Auftrennung der DNS-Fragmente konnten transgene Mäuse anhand des Bandenmusters ermittelt werden (Kapitel 2.2.2).

Von der hier erläuterten Genotypisierung ausgenommen wurden Mäuse der Linie 3xTg-AD x YFP, da deren Zucht nicht im Rahmen dieser Dissertation erfolgte.

2.2.1 DNS-Isolierung

Die Extraktion genomischer DNS aus den Gewebeproben erfolgte mit Hilfe des peqGOLD Tissue DNA Mini Kits (PepLab, Erlangen), welches alle im Folgenden aufgeführten Lösungen beinhaltet: Die einzelnen Schwanzbiopsien bzw. Fellproben wurden nach Zugabe von 400 µl Lysispuffer T, 20 µl Proteinase K und 15 µl RNase für 12 Std. bei 50 °C und 550 U/min in einem Schüttel-Thermoblock (Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Verbliebene feste Bestandteile wurden abzentrifugiert (1 min bei 10.000 U/min) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur DNS-Fällung wurden 400 µl DNS-Bindepuffer hinzugefügt, damit die PerfectBind DNS-Säule beladen und für 1 min bei 10.000 U/min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Säulendurchflusses wurde die gewonnene DNS zweimal mit 500 µl DNS-Waschpuffer gewaschen durch 1-minütige Zentrifugation bei 10.000 U/min. Schließlich erfolgte die DNS-Herauslösung durch Zugabe von zweimal je 100 µl Elutionspuffer und Zentrifugation bei 6.000 U/min für 1 min. Die isolierte DNS wurde bei 4 °C gelagert.

2.2.2 DNS-Amplifizierung und -Auftrennung

Die extrahierten DNS-Proben wurde mittels einer PCR im Mastercycler pro (Eppendorf, Hamburg) amplifiziert (PCR-Ansätze und -Programme für alle Mauslinien: **Tab. 3**). Hierfür wurde 5Prime HotMasterMix (VWR, Ismaning) zusammen mit Transgen-spezifischen Oligonukleotiden (Eurofins MWG Operons, Ebersberg; **Tab. 2**) verwendet. Bei den

Mauslinien Tau P301S und YFP-H wurden Fragmente des humanen *MAPT*-Transgens bzw. des *YFP*-Transgens amplifiziert. Da die beiden Transgene der Linie APP PS1 zusammen vererbt werden, war eine Amplifizierung des humanen *PSEN1*-Gens zur Genotypisierung ausreichend. Die drei Primer der CXCR-PCR setzen vor, hinter, sowie innerhalb der *EGFP*-Insertionsstelle an. Zur Reaktionskontrolle wurden zusätzliche Primer für folgende Endogene eingesetzt: *T-Zell-Rezeptor Untereinheit alpha (Tcra)* bei den Linien Tau P301S und YFP-H sowie *Interleukin-2 (Il-2)* bei der Linie APP PS1. Außerdem dienten DNS-Proben von Wildtyp-Mäusen bzw. von zuvor identifizierten Transgen-Trägern als Negativ- bzw. Positiv-Kontrollen.

Die amplifizierten DNS-Fragmente wurden auf 1,5 %igen Sybr-Gold-Agarosegelen entsprechend ihrer Größe im elektrischen Feld aufgetrennt. Zur Dokumentation der spezifischen Banden (**Abb. 9**) diente ein 3UV-Transilluminator Tisch (UVP, Cambridge, UK) mit integriertem Kamera-System (Powershot G1, Canon).

2.2.3 Quantitative Echtzeit-PCR

Um in den Würfen Tau-heterozygoter Verpaarungen Tau-homozygote von -heterozygoten Nachkommen unterscheiden zu können, wurde eine quantitative Echtzeit-PCR nach der TaqMan-Methode im LightCycler480 (Roche, Mannheim) durchgeführt (q-PCR-Ansatz und -Programm: **Tab. 3**). Hierbei wird das FRET (Förster-/Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer)-Prinzip zur Quantifizierung der DNS-Amplifikate genutzt: Sequenz-spezifische TaqMan-Sonden werden mit zwei fluoreszierenden Farbstoffen markiert, wobei die Fluoreszenz des Donor-Fluorophors (auch als Reporter bezeichnet) unterdrückt wird durch strahlungsfreien Energietransfer an den benachbarten Akzeptor-Fluorophor (auch als Quencher bezeichnet; engl.: quencher = Löscher). Nach Sonden-Einbau während der PCR-Zyklen wird der Quencher durch Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase freigesetzt. Messung der nun unverminderten Reporter-Fluoreszenz gibt Aufschluss über die Menge der gebildeten PCR-Produkte. Unterschiedliche Template DNS-Konzentrationen werden normalisiert durch gleichzeitigen Einsatz Transgen- und Endogen-spezifischer Primer und TaqMan-Sonden (**Tab. 2**). Als Referenzgen diente hier der *Burkitt-Lymphom-Rezeptor 1, Blr1*; als Reporter-Fluorophore fanden FAM (Bandpassfilter 465-510 nm) und Yellow555 (Bandpassfilter 533-580 nm) Verwendung. Nach der DNS-Amplifizierung erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse zur Überprüfung der Qualität bzw. Spezifität der gebildeten Produkte. Homozygote Mäuse wurden durch Vergleich der relativen Ct-Werte (von engl.: cycle threshold = Schwellenwert-Zyklus) identifiziert und das Ergebnis zusätzlich abgesichert durch Supervision des

Motorphänotyps (frühzeitig einsetzende Hinterlaufähmung) sowie Überprüfung des Genotyps ggf. erzeugter Nachkommen (ausnahmslos *MAPT*-Träger).

Tab. 2: (q-)PCR-Primer und -Sonden

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Länge (bp)	T _m (°C)
<i>Blr1</i> _q-PCR_fw	CGG AGC TCA ACC GAG ACC T	19	61,0
<i>Blr1</i> _q-PCR_rev	TGC AAA AGG CAG GAT GAA GA	20	55,3
TaqMan-Sonde <i>Blr1</i>	CTG TTC CAC CTC GCA GTA GCC GAC	24	57,4
<i>Cx3cr1</i> _1	TTC ACG TTC GGT CTG GTG GG	20	61,4
<i>Cx3cr1</i> _2	GGT TCC TAG TGG AGC TAG GG	20	61,4
<i>Cx3cr1</i> _3	GAT CAC TCT CGG CAT GGA CG	20	61,4
<i>Il-2</i> _fw	AAT AGA GAA CGG CAG GA	17	50,4
<i>Il-2</i> _rev	GCC ATG AGG GCA CTA AT	17	52,8
<i>MAPT</i> _fw	GGT TTT TGC TGG AAT CCT GG	20	57,3
<i>MAPT</i> _rev	GGA GTT CGA AGT GAT GGA AG	20	57,3
<i>MAPT</i> _q-PCR_fw	AAG AAG CAG GCA TTG GAG ACA	21	57,9
<i>MAPT</i> _q-PCR_rev	GAC CAG CAG CTT CGT CTT CC	20	61,4
TaqMan-Sonde <i>MAPT</i>	CAG CCT GGA AGA CAG AGC TGC	21	68,0
<i>PSEN1</i> _fw	CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT	24	59,3
<i>PSEN1</i> _rev	GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C	25	61,3
<i>Tcra</i> _fw	GTC AGT CGA GTG CAC AGT TT	20	55,3
<i>Tcra</i> _rev	CAA ATG TTG CTT GTC TGG TG	20	57,3
<i>YFP</i> _fw	TCT GAG TGG CAA AGG ACC TTA GG	23	62,4
<i>YFP</i> _rev	CGC TGA ACT TGT GGC CGT TTA CG	23	64,2

bp: Basenpaare

fw: vorwärts (engl.: forward)

rev: rückwärts (engl.: reverse)

T_m: Schmelztemperatur (engl.: melting temperature)

Tab. 3: (q-)PCR-Ansätze und -Programme

Produkt	Volumen (µl)	Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Zyklen
PCR Mauslinie Tau P301S					
5Prime HotMasterMix	10	1	95	300	1
Primer <i>MAPT_fw</i> (10 µM)	1	2	95	20	37
Primer <i>MAPT_rev</i> (10 µM)	1	3	56	20	
Primer <i>Tcra_fw</i> (20 µM)	0,7	4	72	20	
Primer <i>Tcra_rev</i> (20 µM)	0,7	5	72	120	1
Template DNS	2	6	4	∞	1
H ₂ O	9,6				
PCR Mauslinie APP PS1					
5Prime HotMasterMix	10	1	94	180	1
Primer <i>PSEN1_fw</i> (20 µM)	0,6	2	94	30	35
Primer <i>PSEN1_rev</i> (20 µM)	0,6	3	54	60	
Primer <i>Il-2_fw</i> (20 µM)	0,8	4	72	60	
Primer <i>Il-2_rev</i> (20 µM)	0,8	5	72	120	1
Template DNS	2	6	4	∞	1
H ₂ O	10,2				
PCR Mauslinie YFP-H					
5Prime HotMasterMix	10	1	94	300	1
Primer <i>YFP_fw</i> (10 µM)	1	2	94	20	37
Primer <i>YFP_rev</i> (10 µM)	1	3	61	20	
Primer <i>Tcra_fw</i> (10 µM)	0,7	4	72	20	
Primer <i>Tcra_rev</i> (10 µM)	0,7	5	72	120	1
Template DNS	2	6	4	∞	1
H ₂ O	10,6				
PCR Mauslinie CXCR					
5Prime HotMasterMix	10	1	95	900	1
Primer <i>Cx3cr1_1</i> (10 µM)	1	2	95	30	35
Primer <i>Cx3cr1_2</i> (10 µM)	1	3	60	30	
Primer <i>Cx3cr1_3</i> (10 µM)	1	4	68	120	
Template DNS	1	5	68	600	1
H ₂ O	11	6	4	∞	1
q-PCR Mauslinie Tau P301S					
2x q-PCR Mix	12,5	1	50	120	1
Primer <i>MAPT_q-PCR_fw</i> (50 µM)	0,5	2	95	600	1
Primer <i>MAPT_q-PCR_rev</i> (50 µM)	0,5	3	95	15	40
TaqMan-Sonde <i>MAPT</i> (5 µM)	0,5	4	60	60	
Primer <i>Blr1_fw</i> (50 µM)	0,5	5	50	30	
Primer <i>Blr1_rev</i> (50 µM)	0,5	6	Schmelzkurve	∞	1
TaqMan-Sonde <i>Blr1</i> (5 µM)	0,5				
Template DNS	5				
H ₂ O	4,5				

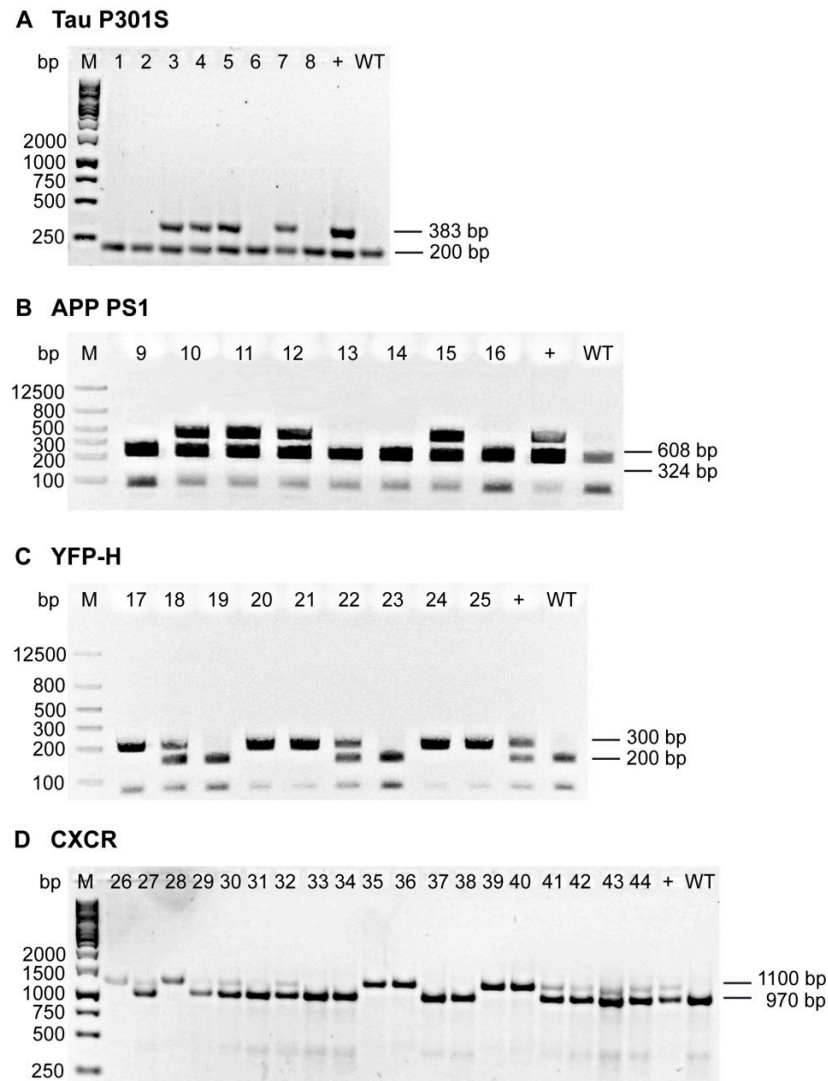


Abb. 9: Agarosegele zur Genotypisierung transgener Mäuse

Dargestellt sind typische Gelelektrophorese-Bandenmuster der unterschiedlichen Mauslinien. **A**, Tau P301S: Zielgen *MAPT*, 383 bp; endogene Kontrolle *Tcra*, 200 bp. **B**, APP PS1: Zielgen *PSEN1*, 608 bp; endogene Kontrolle *Interleukin-2*, 324 bp. **C**, YFP-H: Zielgen *YFP*, 300 bp; endogene Kontrolle *Tcra*, 200 bp. **D**, CXCR: Zielgen *Cx3cr1*; Wildtyp 970 bp, heterozygot 970 & 1100 bp, Knockout 1100 bp. Das hochmolekulare 1100 bp-Amplifikat entsteht durch Insertion des *EGFP*-Transgens. +: Positiv-Kontrolle, 1-44: fiktive Maus-Nummern, bp: Basenpaare, M: DNS-Marker, WT: Wildtyp-Maus als Negativ-Kontrolle.

Tab. 4: Materialien zur Maus-Genotypisierung

Material	Firma, Sitz
peqGOLD Tissue DNA Mini Kit 5Prime HotMasterMix 2,5x 2x q-PCR Mix (q-)PCR-Primer-Oligonukleotide TaqMan-Sonden	Peqlab, Erlangen VWR, Ismaning Eurogentec, Köln Eurofins MWG Operons, Ebersberg Eurogentec, Köln
Sybr-Gold Gel Loading Solution 6x 1 kb DNA-Marker	Invitrogen, Karlsruhe Sigma-Aldrich, Taufkirchen Peqlab, Erlangen
Agarose Essigsäure (100%) Ethanol (100%) NaEDTA Trizma base	SERVA, Heidelberg Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich, Taufkirchen Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Safe Lock Reaktionsgefäße, 1,5 ml Safe Lock Reaktionsgefäße, 2 ml PCR-Reaktionsgefäße, 0,2 ml Mikrotiterplatten (96 Wells) für Light Cycler 480 Verschlussfolie für Mikrotiterplatten Pinzette Schere Skalpell	Eppendorf, Hamburg VWR, Ismaning Eppendorf, Hamburg Roche, Mannheim Roche, Mannheim FST, Heidelberg FST, Heidelberg VWR, Ismaning
Schüttel-Thermoblock Thermomixer comfort Vortexer Vortex Genie 2 Zentrifugen 5430R und 5804R Thermozykler Mastercycler pro Mikrowelle Quickchef 650 Gelelektrophorese-Kammer, -Schlitten, -Kämme Spannungsregler PS200HC UV-Tisch 3UV-Transilluminator Digitalkamera-System Powershot G1 Thermozykler LightCycler480	Eppendorf, Hamburg Scientific Industries, New York, USA Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg Moulinex, Solingen Elchrom Scientific, Cham, Schweiz Hoefer, Holliston, MA, USA UVP, Cambridge, UK Canon, Krefeld Roche, Mannheim

Tab. 5: Pufferlösung zur Maus-Genotypisierung

Tris-Acetat-EDTA-Puffer 121 g Trizma base 9,31 g NaEDTA 28,5 ml Essigsäure mit sterilem Wasser auf 500 ml auffüllen → 50x Stammlösung mit sterilem Wasser 1:50 verdünnen → 1x Arbeitslösung

2.3 Intravitalmikroskopie

Die chronische Intravitalmikroskopie ermöglicht Experimente am lebenden Mausmodell über Zeiträume von Wochen bis Monaten. Dazu wird dem Tier ein kranielles Glasfenster implantiert, durch welches die darunterliegenden Gehirnstrukturen wie z. B. neuronale Somata, Neuriten und dendritische Spines repetitiv untersucht werden können.

2.3.1 Implantation eines chronischen kraniellen Glasfensters

Die Implantation des kraniellen Glasfensters wurde in geringfügiger Abwandlung veröffentlichter Protokolle (Holtmaat et al., 2009; Skoch et al., 2005) durchgeführt (**Abb. 10**). Dabei wurde ein SZ51 Stereomikroskop (Olympus, Hamburg) mit KL 1500 LED Kaltlichtquelle (Schott, Mainz) benutzt. Zur Desinfizierung des Operationsbestecks vor und während der Operation diente ein Tischsterilisator (FST, Heidelberg).

Die Maus wurde mit Ketamin/Xylazin (i.p. (intra_peritoneale, von lat.: intra = innen, peritoneum = Bauchfell) Injektion von 130 bzw. 10 µg/g KGW (Körpergewicht) in 0,9 % NaCl) und ggf. zusätzlich Isofluran (0,8-1,5 % in reinem Sauerstoff, inhaliert über eine Gasmasken) narkotisiert. Außerdem wurden zur Entzündungshemmung und Schmerzlinderung Dexamethason (i.p. Injektion von 6 µg/g KGW in 0,9 % NaCl), Rimadyl (s.c. (subkutane, von lat.: sub = unter, cutis = Haut) Injektion von 7,5 µg/g KGW in 0,9% NaCl), sowie Cefotaxim (s.c. Injektion von 250 µg/g KGW in 0,9% NaCl) verabreicht. Nach Narkose-Überprüfung (Ausfall des Zwischenzehreflexes) wurde der Kopf der Maus mit Ohrstiften und Beissbügel in einer Halterung fixiert (**Abb. 10A**). Ein Heizkissen verhinderte ein Auskühlen des anästhesierten Tieres, eine dünne Bepanthen-Schicht ein Austrocknen der Augen. Das Kopffell wurde mit Ethanol-getränkten sterilen Wattestäbchen desinfiziert (**Abb. 10B**) und unter Vermeidung von Muskelgewebe-Verletzungen mit einer Schere großflächig entfernt (**Abb. 10C**). Nun wurde die Knochenhaut mit einem Skalpell sorgfältig abgeschabt (**Abb. 10D**) und der freigelegte Schädel mit einer Kanüle vorsichtig aufgeraut, bevor er mit einer Schicht schnell trocknendem Cyano-Veneer Flüssigkleber bedeckt wurde (**Abb. 10E**). Dabei wurde der Bereich des rechten Scheitelbeins (lat.: *Os parietale*) ausgespart, in dem die Fensterimplantation erfolgte (zentriert ca. 2 mm caudal des Bregma und 2,5 mm lateral der Pfeilnaht; lat.: *Sutura sagittalis*; alternativ wurde einigen Tieren das Fenster weiter rostral implantiert, zentriert auf der Pfeilnaht ca. 1 mm rostral des Bregma). Mit Hilfe eines Zahnarzt-Bohrers wurde dann sorgsam ein kreisrundes Loch von ca. 4 mm Durchmesser in der Schädeldecke ausgehoben, ohne den Knochen dabei punktuell zu durchstoßen (**Abb. 10F**). Die Bohrspäne wurden mit einem sterilen Vakuum-Aufsatz abgesaugt (**Abb. 10G**). Das

Schädelstück wurde mit einer Pinzette entfernt (**Abb. 10H**) und die Gehirnoberfläche sofort mit sterilem PBS (von engl.: phosphate buffered saline = phosphatgepufferte Kochsalzlösung) bedeckt (**Abb. 10I**). Auftretende Blutungen wurden mit hämostatischem Schaumstoff und sterilen Saugtupfern gestoppt und Bohrspäne sowie Blutreste mit sterilem PBS weggespült. Durch Aufsetzen eines mit Ethanol gereinigten runden Glasplättchens von 5 mm Durchmesser wurde das Schädelloch verschlossen (**Abb. 10J**) und mit Cyano-Veneer Dentalzement vollständig mit der Schädeldecke versiegelt (**Abb. 10K**). Die restliche offenliegende Schädeldecke wurde ebenfalls dünn mit Dentalzement bedeckt, wobei zur späteren Fixierung des Mauskopfs unter dem Mikroskop ein Metallplättchen mit Schraubbohrung planar neben dem Glas angebracht wurde (**Abb. 10L-M**). Bei Fenstereinbau weiter rostral

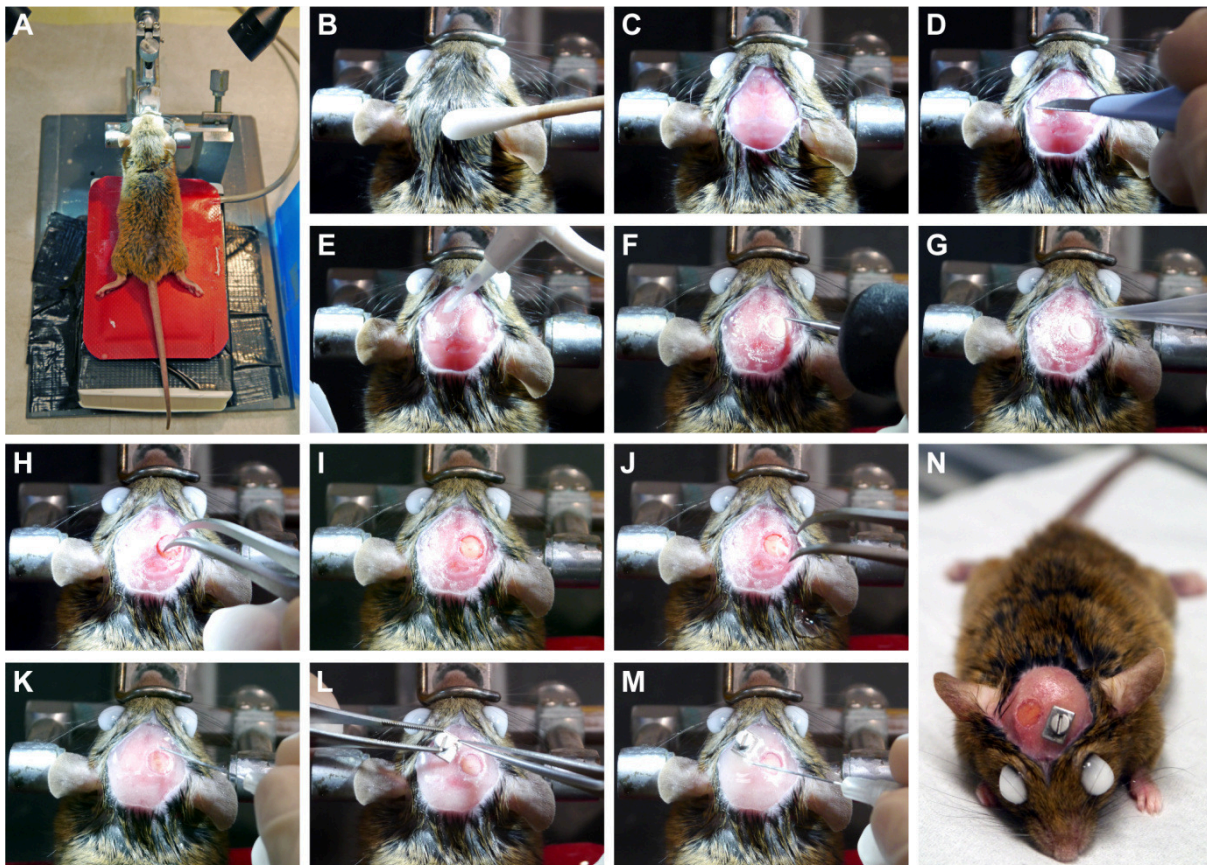


Abb. 10: Einbau des chronischen kraniellen Fensters

A, Fixierung des Mauskopfs mittels Ohrstiften und Beißbügel. Zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur dient ein Heizkissen. **B**, Kopffell-Desinfizierung mit Ethanol. **C**, Offenliegende Schädeldecke nach partiellem Entfernen der Kopfhaut. **D**, Abschaben der Knochenhaut und Aufrauen des Schädelknochens mit einem Skalpell. **E**, Bepinseln der Schädeldecke mit Flüssigkleber. **F**, Ausheben des runden kraniellen Fensters mit einem Zahnarztbohrer. **G**, Absaugen der Bohrspäne. **H**, Abheben der Schädeldecke. **I**, Offenliegende Gehirnoberfläche, mit PBS bedeckt. **J**, Aufsetzen des Glasplättchens. **K**, Versiegeln des Fensters mit Dentalzement. **L**, Aufsetzen des Metallplättchens zur Kopffixierung beim Mikroskopieren. **M**, Befestigung des Metallplättchens und Versiegeln der Schädeldecke mit Dentalzement. **N**, Maus mit frisch eingebautem kraniellen Fenster.

wurde statt des Metallplättchens ein Z-Stift aus Titan verwendet (**Abb. 11B**).

Während der Operation wurden Fellproben von der Schädeldecke gesammelt, um mittels daraus isolierter DNS den Genotyp der Tiere zusätzlich abzusichern (siehe Kapitel 2.2). Anschließend wurden die Mäuse einzeln im IVC-System des externen Tierstalls im Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung der LMU in München unter SPF-Bedingungen gehalten. Zur postoperativen Erholung und zum Abklingen inflammatorischer Prozesse unter dem kraniellen Fenster wurde den Tieren vor Beginn der intravitalmikroskopischen Untersuchungen eine Ruhephase von mindestens 3 Wochen eingeräumt.

2.3.2 Zwei-Photonen-Intravitalmikroskopie

Zur Durchführung der Zwei-Photonen-Intravitalmikroskopie wurde die Maus mit Ketamin/Xylazin (i.p. Injektion von 130 bzw. 10 µg/g KGW in 0,9 % NaCl) narkotisiert und die Augen als Austrocknen-Schutz mit Bepanthen bedeckt. Das am Schädel angebrachte Metallplättchen (**Abb. 10L-N, Abb. 11A, C**) diente zur Schraubfixierung des Schädels an eine Lochplatte, welche wiederum auf eine Adapterplatte montiert wurde (**Abb. 11D**). Mäuse mit weiter rostral implantiertem Fenster (**Abb. 11B**) wurden mittels Z-Stift und Clip-Halterung fixiert (**Abb. 11F**). Das Deckglas wurde vorsichtig, ohne starke Druckausübung, mit einem Skalpell gereinigt und Öffnungen zwischen Lochplatte und Schädeldecke mit Vaseline abgedichtet. Dann wurde die Maushalterung auf dem X-/Y-achsial verstellbaren Mikroskoptisch 380 FM (Luigs und Neumann, Ratingen) montiert (**Abb. 11E, G**). Zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur des narkotisierten Tieres während der maximal einstündigen Mikroskopie-Sitzung wurde ein Heizkissen verwendet. Als Immersionsflüssigkeit wurden wenige Tropfen destillierten Wassers zwischen Deckglas und Objektiv aufgetragen.

Zum Anfärben amyloider Plaques wurde der Maus ca. 15-20 Stunden vor dem Mikroskopieren das gehirngängige Kongorot-Derivat Methoxy-X04 (Klunk et al., 2002) i.p. injiziert (2 µg/g KGW). Dazu wurden 5 mg Methoxy-X04 in 100 µl DMSO gelöst und 450 µl 1,2-Propanediol, 450 µl PBS sowie wenige Tropfen 1 N NaOH zugegeben.

Um potenzielle NFT-ähnliche kortikale Tau-Aggregate zu markieren, wurden zwei fluoreszierende, Amyloid-bindende Farbstoffe ausgetestet: Das gehirngängige Kongorot-Derivat FSB (von engl.: (trans,trans)-1-fluoro-2,5-bis(3-hydroxycarbonyl-4-hydroxy)styrylbenzene; Sato et al., 2004; Higuchi et al., 2005) wurde vier Stunden vor der Mikroskopie-Sitzung in die Schwanzvene injiziert (0,1 % FSB in PBS mit 2 % Mausalbumin; entsprechend Velasco et al., 2008). Alternativ wurde – wie von De Calignon et al. (2009) – im Rahmen der

Fensterimplantation 0,025 % Thioflavin-S in sterilem PBS nach vorsichtigem Entfernen der Hirnhaut (lat.: *Dura mater*) direkt auf die exponierte Gehirnoberfläche appliziert. Nach 20 min wurde mit PBS nachgespült und die Schädelöffnung zur unmittelbar anschließenden Intravitalmikroskopie verschlossen.

Der Mikroskopie-Aufbau setzte sich zusammen aus dem LSM 5 MP Laserscanningmikroskop (Carl Zeiss MicroImaging, Jena), in welches der spektral abstimmbare (710-920 nm) Titan:Saphir-Laser MaiTai XF-W1S (Newport Spectra Physics, Darmstadt) eingekoppelt wurde (**Abb. 11G**). Als Detektoren dienten Auflicht-NDDs (von engl.: non-descanned detectors) in Form von Fotoelektronenvervielfachern. In Abhängigkeit von den spektralen Eigenschaften der zu detektierenden Fluorophore wurden unterschiedliche Anregungswellenlängen verwendet und entsprechende dichroitische Kurzpass(KP)-Strahlteiler und Bandpass(BP)-Filter in den Strahlengang geschaltet: Die YFP-Anregung erfolgte bei 880 nm unter Verwendung des Hauptfarbteilers KP650 in Kombination mit dem Filter BP500-550. Methoxy-X04 wurde bei 750 nm angeregt unter Einsatz des Hauptfarbteilers KP700/488 mit nachgeschaltetem Filter BP435-485.

Für alle mittels der LSM510 Software (Version 4.2, Carl Zeiss MicroImaging, Jena) erzeugten Aufnahmen wurde ein 20x Wasser-Immersionsobjektiv (1,0 NA; Carl Zeiss MicroImaging, Jena) verwendet. Zunächst wurden unter Epifluoreszenz-Beleuchtung geeignete Positionen auf der Gehirnoberfläche per Okular gesucht. Zum Wiederauffinden dieser Stellen in nachfolgenden Mikroskopie-Sitzungen wurden mit einer am Mikroskop angeschlossenen Powershot A95 Digitalkamera (Canon, Krefeld) Fotos der charakteristischen Blutgefäßmuster angefertigt (**Abb. 11H'-H''**). Dann wurden an jeder Position Bildstapel der YFP-exprimierenden Neuronen von 425 x 425 x 350 μm^3 mit 0,41 x 0,41 x 3,00 μm^3 XYZ-Auflösung erzeugt (**Abb. 11I**). Innerhalb dieser Übersichtsaufnahmen wurden nun einzelne, möglichst parallel zur Gehirnoberfläche verlaufende dendritische Elemente in einer Tiefe von 50-120 μm ausgewählt und hochauflösend aufgenommen (0,16 x 0,16 x 1,00 μm^3 XYZ-Auflösung; **Abb. 11I'**).

Um sicherzustellen, dass diese apikalen Dendriten von Schicht V Neuronen stammten, wurden nur Dendritenabschnitte ausgewählt, deren Ast sich in eine Tiefe von mindestens 350 μm zurückzuverfolgen ließ. Ebenfalls YFP-transgene Schicht II/III Neuronen, deren Somata sich in Tiefen von ca. 150-300 μm befinden, konnten somit als Ursprung des Dendritenbaums ausgeschlossen werden. In darauffolgenden Mikroskopie-Sitzungen wurden zuvor aufgenommene Regionen durch präzisen Abgleich der Blutgefäßmuster, neuronalen Zellkörper und Prozesse relokalisiert. Die Laserleistung wurde innerhalb eines Bildstapels an die Gewebetiefe (Z-Korrektur) sowie zwischen den einzelnen Mikroskopie-Sitzungen an eventuelle Unterschiede der Fensterqualität angepasst, sodass das gemessene

Fluoreszenzsignal konstant blieb. Um Gewebeschädigungen durch Laser-induzierte Phototoxizität zu verhindern, wurden dabei stets weniger als 50 mW Leistung eingesetzt.

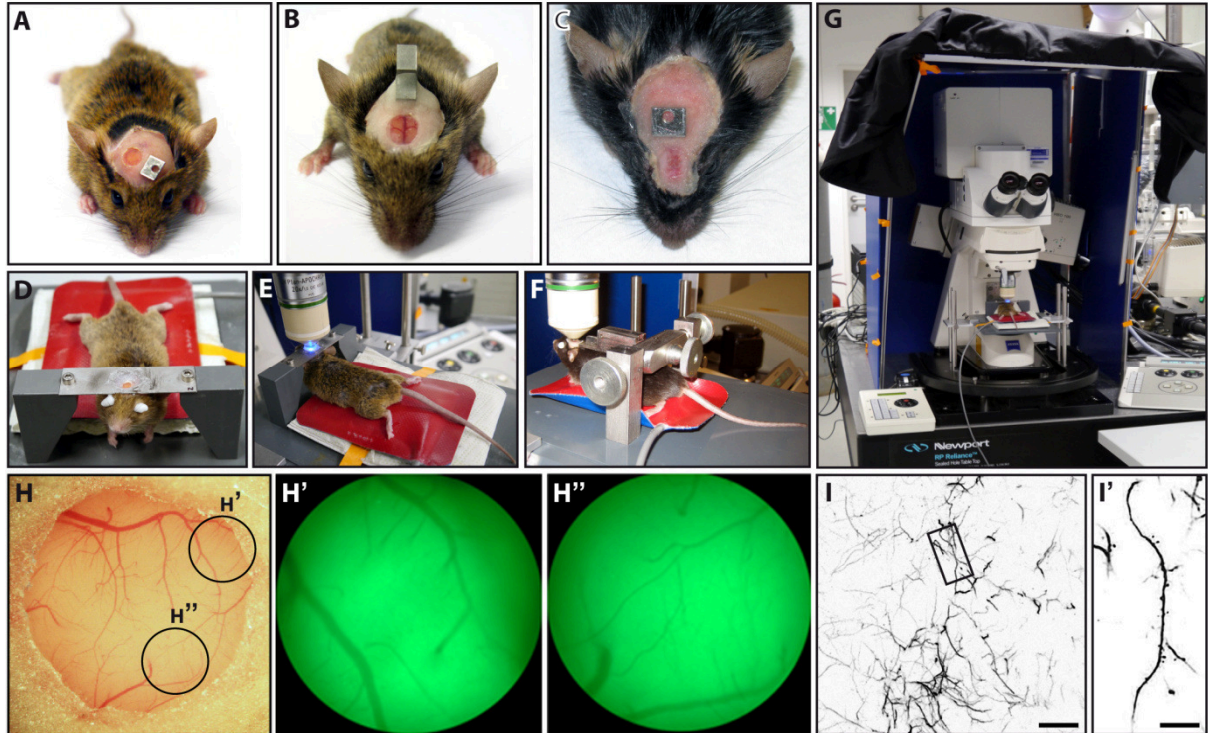


Abb. 11: Intravitalmikroskopie

Chronische kortikale Fenster können über verschiedene Gehirnregionen implantiert werden, so z. B. (wie in dieser Studie) rechtshemisphärisch über dem visuellen/somatosensorischen Kortex (**A**), weiter frontal, mittig über dem Motorkortex (**B**) oder zwischen den Augen, über dem Riechkolben (lat.: *Bulbus olfactorius*, **C**). Zur Intravitalmikroskopie wird der Mäusekopf mit einer Schraube (**D-E**, bei Verwendung des Metallplättchens mit Schraubgewinde wie in **A**, **C**) oder Clip-Halterung (**F**, bei Verwendung des Z-Stifts wie in **B**) fixiert. **G**, Mikroskopie-Aufbau mit narkotisierter, fixierter Maus auf Wärmekissen. **H**, Durch das kraniale Fenster ist das Blutgefäßsystem deutlich erkennbar. Die mit Kreisen markierten Regionen sind in **H'-H''** durch das 20x Objektiv zu sehen: Bei Anregung mit einer Epifluoreszenz-Lampe zeichnen sich die Blutgefäße dunkel gegen den durch YFP-Emission erhellen Hintergrund ab. **I**, Übersichtsaufnahme der YFP-exprimierenden apikalen dendritischen Elemente. **I'**, Vergrößerung des in **I** mit einem Rechteck markierten Dendritenabschnitts mit ausgehenden Spines. **I-I'** zeigen invertierte Maximumintensitätsprojektionen von 50 bzw. 10 μm Z-Stapeln. Maßstabsbalken: **I** 50 μm , **I'** 10 μm .

Tab. 6: Materialien zur Fensterimplantation und Intravitalmikroskopie

Material	Firma, Sitz
Ketamin 10 % Xylazin Dexamethason Rimadyl (Wirkstoff Carprofen) Cefotaxim Isofluran (Forene)	WDT, Garbsen Bayer HealthCare, Leverkusen Sigma-Aldrich, Taufkirchen Pfizer, Berlin Pharmore, Ibbenbüren Abbott, Wiesbaden
Inhalations-Narkosegerät Trajan808 Gasmasken für Mäuse Heizkissen für Mäuse Mauskopfhaltung mit Ohrstiften zur Operation Mauskopfhaltung mit Schraub- oder Clip-Fixierung zur Mikroskopie Bepanthen Vaseline	Dräger Medical, Lübeck Eigenbau FST, Heidelberg Eigenbau Eigenbau Bayer HealthCare, Leverkusen ABO Pharma, Pellingen
Stereomikroskop SZ51 Kaltlichtquelle KL 1500 LED mit Schwanenhals-Lichtleiter Tischsterilisator FST 250 Hot Bead Sterilizer Bohrer C1 Master Bohrgestänge Vakuum-Absaugvorrichtung	Olympus, Hamburg Schott, Mainz FST, Heidelberg Schick Dentalgeräte, Schemmerhofen Gebrüder Brasseler, Lemgo Eigenbau
Spritzen Kanülen PBS (pH 7,4) Ethanol (70 %) Operationsbesteck (Schere & Pinzetten) Skalpells Pinse Wattestäbchen, steril hämostatischer Schaumstoff Gelfoam Sponge Saugtupfer Sugi, steril Deckgläser Dentalkleber Cyano-Veneer Starter Kit Metallplättchen mit Schraube Z-Stift aus Titan	VWR, Ismaning VWR, Ismaning Invitrogen, Karlsruhe Sigma-Aldrich, Taufkirchen FST, Heidelberg Swann-Morton, Sheffield, UK Henry Schein Dental Depot, München Paul Böttger, Bodenmais Pfizer, Berlin Kettenbach, Eschenburg Gerhard Menzel, Braunschweig Hager & Werken, Duisburg Eigenbau Eigenbau
Methoxy-X04 DMSO 1,2-Propanediol NaOH FSB Mausalbumin Thioflavin-S	Prof. Boris Schmidt, TU Darmstadt Sigma-Aldrich, Taufkirchen Sigma-Aldrich, Taufkirchen Sigma-Aldrich, Taufkirchen Dojindo, München Sigma-Aldrich, Taufkirchen Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Laserscanningmikroskop LSM 5 MP Hauptfarbteiler KP650, KP700/488 Bandpass-Filter BP435-485, BP500-550 Objektiv W Plan-Apochromat 20x/1,0 DIC Epifluoreszenz-Lampe HBO 103 W/2 Titan:Saphir-Laser MaiTai XF-W1S X,Y-Verschiebetisch 380 FM Powershot A95 Digitalkamera	Carl Zeiss MicroImaging, Jena Carl Zeiss MicroImaging, Jena Carl Zeiss MicroImaging, Jena Carl Zeiss MicroImaging, Jena Carl Zeiss MicroImaging, Jena Newport Spectra Physics, Darmstadt Luigs und Neumann, Ratingen Canon, Krefeld

2.3.3 Bildbearbeitung und Datenanalyse

Vor der Auswertung wurden alle Bilder hinsichtlich des Maus-Genotyps verblindet. Zur Analyse der Dichte und Plastizität dendritischer Spines wurde die ZEN 2009 Light Edition Software (Carl Zeiss MicroImaging, Jena) verwendet. Die vierdimensionalen Rohdaten wurden zur Kontrastverschärfung mit einem Gamma von 0,45 korrigiert, bevor Spines manuell markiert und ausgezählt wurden. Da die Z-Auflösung auf 1 µm limitiert war, wurden primär lateral von den Dendriten ausgehende Fortsätze erfasst. In Zeitserien wurden durch direkten Vergleich mit den am vorherigen Aufnahmezeitpunkt erzeugten Daten stabile, neu entstandene und verlorene Spines unterschieden. Dabei wurden Spines als identisch bzw. stabil definiert, wenn ihre Position sich zwischen zwei Aufnahmezeitpunkten in einem Bereich von weniger als 1 µm entlang des Dendriten veränderte. Zur Ermittlung der zweidimensionalen Spine-Dichte (Spines/µm) wurde die Länge des analysierten Dendritenabschnitts gemessen. In Tau x APP PS1-Mäusen wurde die Entfernung der untersuchten Dendritenelemente zu amyloiden Plaques durch Messung des geringsten Abstands zu einem Methoxy-X04-positiven Plaque-Rand im Z-Stapel ermittelt.

Für morphologische Spine-Analysen unterliefen die dreidimensionalen intravital-mikroskopischen Aufnahmen eine Dekonvolution mittels AutoQuant Software (Version X2.0.1, Media Cybernetics, Bethesda, USA) und wurden dann semi-automatisch nachmodelliert mit der Imaris 6.1.5 Software (Bitplane, Zürich, Schweiz). Die Spine-Klassifizierung erfolgte entsprechend folgender hierarchischer Algorithmen (modifiziert nach Harris et al. 1992): mushroom Spine: maximale Kopfweite / minimale Halsweite > 1,4 und maximale Kopfweite > 0,4 µm und minimale Halsweite > 0 µm; stubby Spine: Spinelänge / mittlere Halsweite ≤ 3 oder minimale Halsweite = 0 µm oder minimale Halsweite > 0,5 µm; thin Spine: Spinelänge / mittlere Halsweite > 3.

Zur Neuronenverlust-Analyse wurden YFP-exprimierende Schicht II/III Pyramidenneuronen in den 350 µm tiefen Übersichtsaufnahmen der ersten und letzten Mikroskopie-Sitzung mittels ZEN 2009 Light Edition Software manuell ausgezählt und die Summe der Zellen verglichen.

Für exemplarische Dendriten-Abbildungen wurden die Rohdaten nach einer Dekonvolution mit der Adobe Photoshop CS4 Extended Software (Version 11.0.2, Adobe Systems, San Jose, CA, USA) zugeschnitten, invertiert, der Kontrast angepasst und ggf. Signale benachbarter neuritischer Elemente entfernt.

2.4 Immunhistochemische Färbungen

Die intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurden ergänzt durch immunhistochemische Färbungen fixierter Mausgehirn-Schnitte, welche licht- und elektronenmikroskopische Analysen prä- und postsynaptischer Spezialisierungen sowie pathologischer Tau- und A β -Ablagerungen ermöglichten. Alle nachfolgend tabellarisch aufgeführten Färbeprotokolle wurden bei Raumtemperatur durchgeführt unter permanenter langsamer Bewegung der freischwimmenden Gehirnschnitte mittels eines Schüttlers.

2.4.1 Gehirngewebefixierung mittels transkardialer Perfusion

Zur Blutentleerung und Fixierung des Mausgehirns wurde vor der Gewebeentnahme eine transkardiale Perfusion durchgeführt: Die Maus wurde mit Ketamin/Xylazin (i.p. Injektion von 130 bzw. 10 μ g/g KGW in 0,9 % NaCl) und ggf. zusätzlich Isofluran (0,8-1,5 % in reinem Sauerstoff, inhaliert über eine Gasmasken) narkotisiert und mit exponierter Bauchseite auf einer Halterung fixiert. Nach Entfernen des Bauchfells und seitlicher Durchtrennung der Rippen wurde die Bauchdecke über dem Herzen geöffnet und der Thoraxraum freigelegt. Eine per Schlauch mit einem Pumpsystem verbundene Perfusionskanüle wurde in die linke Herzkammer eingeführt. Das Durchtrennen der absteigenden Aorta (lat.: *Aorta descendens*) ermöglichte das Abfließen des Blutes und der Perfusionsflüssigkeit nach Durchströmen des oberen Körperkreislaufs. Mit einer Pumpgeschwindigkeit von 7-8 ml/min, unter Nachahmung des natürlichen Blutdrucks, wurde fünf Minuten lang mit PBS vorgespült, bis das gesamte Blut durch die isotone Lösung ersetzt war. Dann wurde für 8 min mit dem auf 4 °C abgekühlten Fixativ bestehend aus 4 % Paraformaldehyd (PFA) in 0,1 M Phosphatpuffer (für die Lichtmikroskopie) bzw. 4 % PFA und 0,1 % Glutaraldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer (für die Elektronenmikroskopie) perfundiert. Durch Quervernetzung und Brückenbildung mit Proteinen im Gewebe wirken PFA und Glutaraldehyd als Fixiermittel und erhöhen somit die Gewebefestigkeit bei Bewahrung der natürlichen Struktur.

Zur Gewebeentnahme wurde der Kopf der Maus abgetrennt und nach Entfernen der Kopfhaut das Gehirn vorsichtig freipräpariert. Die äußere Hirnhaut (lat.: *Dura mater*) wurde abgelöst und das Gehirn über Nacht bei 4 °C in 4 % PFA in PBS postfixiert. Außerdem wurden den Mäusen Schwanzbiopsien entnommen, um mittels daraus isolierter DNS den Genotyp der Tiere zusätzlich abzusichern (siehe Kapitel 2.2).

Kremer et al. (2011) empfehlen zur verbesserten immunhistochemischen Detektion des Tau-Proteins in dendritischen Spines eine alternative Gewebefixierung mittels Bouin-Fixativ, bestehend aus 71,4 % gesättigter Pikrinsäure, 23,8 % Formaldehyd und 4,8 %

Eisessigsäure. Zum direkten Vergleich der unterschiedlichen Fixierungsmethoden wurden daher einige Mäuse mit auf 4 °C abgekühltem PBS perfundiert und jeweils eine Gehirnhemisphäre über Nacht bei 4 °C in Bouin-Fixativ bzw. in 4 % PFA in PBS fixiert.

2.4.2 Anfertigung von Mausgehirn-Vibratomschnitten

Zur Erzeugung 70 bzw. 100 µm dünner Mausgehirn-Schnitte wurde ein VT 1000S Vibratom (Leica Microsystems, Wetzlar) benutzt. Das Gehirn wurde mit einer entfetteten Rasierklinge zurechtgetrimmt und mit Sekundenkleber auf der Vibratom-Bühne fixiert. Die Vibratom-Wanne wurde mit PBS gefüllt, sodass das Präparat stets mit Flüssigkeit bedeckt war, während bei niedriger Schnittgeschwindigkeit und hoher Vibrationsamplitude Frontalschnitte angefertigt wurden.

2.4.3 Färbeprotokolle für die Lichtmikroskopie

Der Expressionsnachweis des humanen *MAPT*-Gens bzw. die Markierung von Phospho-Tau erfolgte mittels der Antikörper-Klone HT7, AT8, AT100 und AT180. Der Antikörper HT7 bindet an ein Epitop innerhalb der Aminosäurereste 159-163 des humanen Tau-Proteins. Die anderen Phosphoepitop-spezifischen Antikörper erkennen humanes und murines Tau-Protein, welches an folgenden Aminosäuren phosphoryliert ist: Serin202 und Threonin205 (AT8); Serin212 und Threonin214 (AT100); Threonin231 und Serin235 (AT180). Dabei ist nur der Antikörper AT100 spezifisch für aggregiertes fibrilläres Tau-Protein, während AT8 und AT180 auch an lösliche und unlösliche präfibrilläre Formen des Proteins binden.

Zur Detektion der biotinylierten Antikörper HT7, AT8 und AT180 wurde ein TSA-Kit (Tyramid-Signal-Amplifizierung; Invitrogen, Karlsruhe) verwendet (**Tab. 7**): Bindung von Streptavidin-HRP (von engl.: horse raddish peroxidase = Meerrettichperoxidase) an die Biotin-Antikörper-Konjugate ermöglicht die lokale HRP-katalysierte Immobilisierung der fluoreszenzmarkierten Tyramid-Moleküle (hier: Alexa Fluor 647). Zur Analyse Phospho-Tau-enthaltender neuritischer Dystrophien um amyloide Plaques herum wurden die Schnitte zusätzlich zur AT8-Antikörpermarkierung mit dem fluoreszierenden Farbstoff Methoxy-X04 angefärbt (**Tab. 7****).

Auch zur Identifizierung von Axonen durch Detektion von Neurofilament-L (NF-L) fand dieses Färbeprotokoll Verwendung, wobei der unmarkierte NF-L-Antikörper in einem Zwischenschritt durch ein Sekundärantikörper-Biotin-Konjugat biotinyliert wurde (**Tab. 7***).

Für Dichte-Untersuchungen prä- und postsynaptischer Spezialisierungen wurden unmarkierte Synapsin1/2-, Synaptophysin- und PSD-95-Primärantikörper mit Alexa Fluor

647-konjugierten Sekundärantikörpern detektiert (**Tab. 8**). Entsprechende Färbeschritte wurden bei Verwendung des unmarkierten Phospho-Tau-Antikörpers AT100 durchgeführt (**Tab. 8**).

Tab. 7: Protokoll Tyramid-Alexa Fluor 647 Einzelfärbung (AT8, AT180, HT7, NF-L)

Vorgang	Dauer	Lösung
Gewebe-Aufschluss	über Nacht	2 % Triton X-100 in PBS
Blockieren des endogenen Biotin	4 h	Biotin Blocking Kit Reagenz A (Streptavidin)
Waschen	3 x 15 min	PBS
Blockieren des endogenen Biotin	4 h	Biotin Blocking Kit Reagenz B (Biotin)
Waschen	3 x 15 min	PBS
Vorinkubation	über Nacht	10 % NGS, 1 % BSA und 0,1 % Triton X-100 in PBS
Primärantikörper-Inkubation	über Nacht	(biotinylierter) Primärantikörper in 5 % BSA und 0,1 % Triton X-100 in PBS
Waschen	3 x 15 min	PBS
* Biotinylierung des NF-L Antikörpers	4 h	biotinylierter Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen) in 1 % BSA in PBS
* Waschen	3 x 15 min	PBS
Streptavidin-Biotin-Konjugation	über Nacht	Streptavidin-HRP (1:100) in 1 % BSA in PBS
Waschen	3 x 15 min	PBS
Sekundärantikörper-Inkubation	3 h	Tyramid-Alexa Fluor 647-Konjugat (1:200) und 0,0015 % H ₂ O ₂ in Amplifikationspuffer
** Waschen	3 x 15 min	PBS
** Anfärben fibrillärer A β -Plaques	30 min	145 μ M Methoxy-X04
Waschen	5 x 10 min	PBS

* nur für die Detektion von NF-L

** optional für die zusätzliche Detektion fibrillärer A β -Plaques

BSA: bovines Serumalbumin

NGS: normales Ziegen Serum (engl.: normal goat serum)

Tab. 8: Protokoll Alexa Fluor 647 Einzelfärbung (AT100, PSD-95, Synapsin1/2, Synaptophysin)

Vorgang	Dauer	Lösung
Gewebe-Aufschluss	über Nacht	2 % Triton X-100 in PBS
Vorinkubation	5 h	10 % NGS, 1 % BSA und 0,1 % Triton X-100 in PBS
Primärantikörper-Inkubation	über Nacht	Primärantikörper* in 5 % BSA und 0,1 % Triton X-100 in PBS
Waschen	3 x 15 min	PBS
Sekundärantikörper-Inkubation	4 h	Sekundärantikörper**-Alexa Fluor 647-Konjugat in 1 % BSA in PBS
Waschen	5 x 10 min	PBS

* AT100: 1:200; PSD-95: 1:200; Synapsin1/2: 1:1000; Synaptophysin: 1:500

** AT100: Anti-Maus (1:200); PSD-95: Anti-Maus (1:500); Synapsin1/2: Anti-Kaninchen (1:500); Synaptophysin: Anti-Kaninchen (1:200)

Im Anschluss an die jeweiligen Färbungen wurden die Schnitte auf Objektträger überführt und mit Fluorescence Mounting Medium (Dako, Glostrup, Dänemark) nass eingedeckt. Ein Versiegeln der Deckgläschen mit Nagellack am nächsten Tag verhinderte das Eindringen von Luft. Die Objektträger wurden bei 4 °C lichtgeschützt im Kühlschrank gelagert.

2.4.4 Konfokale Laserscanningmikroskopie

Aufnahmen der Fluoreszenzfärbungen wurden mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop angefertigt, welches auf einen inversen Mikroskopaufbau montiert war (LSM 510 und AxioVert 200, Carl Zeiss MicroImaging, Jena). Dabei wurden ein 10x Luftobjektiv (Plan-Neofluar, NA 0,3), ein 25x Öl-Immersionsobjektiv (LD LCI Plan-Apochromat, NA 0,8) oder ein 40x Öl-Immersionsobjektiv benutzt (Plan-Apochromat, NA 1,3; je von Carl Zeiss MicroImaging, Jena). YFP und EGFP wurden mit einem 488 nm Argon-Laser angeregt und die Emission nach einem 500-550 nm Bandpassfilter bzw. 505 nm Langpassfilter detektiert. Die Anregung von Alexa Fluor 647 erfolgte mit einem 633 nm Helium-Neon-Laser bei nachgeschaltetem 650 nm Langpassfilter im Emissionsstrahlengang. Für Methoxy-X04 wurden (den Einstellungen zur Intravitalmikroskopie entsprechend) eine 750 nm 2-Photonen-Anregung sowie ein 435-485 nm Bandpassfilter benutzt.

Für eine Korrelation AT8- und YFP-positiver Zellen in Tau x YFP-Mäusen wurden pro Tier 10 Z-Stapel von Schicht V Neuronen im visuellen Kortex aufgenommen (360 x 360 x 50 μm^3 ; 0,35 x 0,35 x 3,00 μm^3 XYZ-Auflösung; 25x Objektiv).

Zur Analyse der Synapsin1/2-, und PSD-95-Färbungen wurden $75 \times 75 \mu\text{m}^2$ Bilder mit $0,11 \mu\text{m}$ XY-Auflösung erzeugt (40x Objektiv). Pro Tier wurden jeweils 5 nicht-überlappende Aufnahmen von Schicht II/III des visuellen Kortex sowie Stratum Oriens und Stratum Radiatum in der CA1-Region (von lat.: Cornu ammonis = Ammonshorn) der Hippocampusformation analysiert (**Abb. 12**).

Zur Auswertung der Synaptophysin-Färbungen wurden $225 \times 225 \mu\text{m}^2$ Bilder mit $0,11 \mu\text{m}$ XY-Auflösung aufgenommen (40x Objektiv). Pro Tier wurden jeweils 4 benachbarte Aufnahmen von Schicht II/III des visuellen Kortex und des entorhinalen Kortex analysiert (**Abb. 12**).

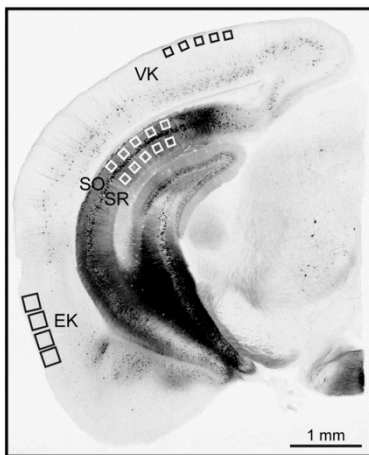


Abb. 12: Regionenauswahl zur Synapsendichte-Analyse

Der Frontalschnitt zeigt die Platzierungen der je 5 Aufnahmefelder im visuellen Kortex (VK), Stratum Oriens (SO) und Stratum Radiatum (SR) zur Analyse der PSD-95- und Synapsin1/2-Färbungen. Synaptophysin-Dichteanalysen wurden in je 4 Aufnahmefeldern im visuellen und entorhinalen Kortex (EK) durchgeführt. Die abgebildete YFP-Aufnahme wurde zur Kontrasterhöhung invertiert.

Zur Dichtemessung AT8-positiver Zellen in Tau x CXCR-Mäusen wurden Übersichtsaufnahmen gesamter Hemisphären im Tile Scan Modus mosaikförmig aufgenommen ($900 \times 900 \mu\text{m}^2$, Pinhole offen; $0,88 \times 0,88 \mu\text{m}^2$ XY-Auflösung; 10x Objektiv).

Entsprechende Übersichtsaufnahmen wurden für die Analyse der Plaque- und Tau-Pathologie in Tau x APP PS1-Mäusen erzeugt. Zur Korrelation amyloider Plaques mit assoziierten Phospho-Tau-enthaltenden neuritischen Dystrophien wurden pro Tier 12 Plaques unterschiedlicher Größen im visuellen Kortex ausgewählt und Z-Stapel der AT8-Methoxy-X04-Doppelfärbungen angefertigt ($112,5 \times 112,5 \times 20-60 \mu\text{m}^3$; $0,11 \times 0,11 \times 1,00 \mu\text{m}^3$ XYZ-Auflösung).

2.4.5 Bildbearbeitung und Datenanalyse

2.4.5.1 Auswertung der Phospho-Tau-Färbungen

Der Anteil Phospho-Tau-positiver Zellen (Antikörper AT8) an YFP-exprimierenden Schicht V Neuronen in Tau x YFP-Mäusen wurde ermittelt mit Hilfe der ZEN 2009 Light Edition Software (Carl Zeiss MicroImaging, Jena) durch manuelles Markieren der jeweiligen Zell- Populationen sowie deren Schnittmenge im Z-Stapel.

Die Dichte Phospho-Tau-enthaltender kortikaler Zellen (Antikörper AT8) in Tau x CXCR- bzw. Tau x APP PS1-Mäusen wurde ermittelt mit Hilfe der LSM510 Software (Version 4.2, Carl Zeiss MicroImaging, Jena) durch manuelles Ausmessen der Kortexfläche sowie Markieren AT8-positiver Zellen.

2.4.5.2 Synapsendichte-Auswertung

Zur Bestimmung der Dichtewerte PSD-95-, Synapsin1/2- oder Synaptophysin-positiver synaptischer Spezialisierungen wurde zunächst eine Bild-Dekonvolution durchgeführt (AutoQuant, Version X2.0.1, Media Cybernetics, Bethesda, USA). Die weitere Bild- Prozessierung und Punkte-Detektion erfolgte mit der Igor Pro Software (Version 6.2.3.3, Wavemetrics, Portland, OR, USA), basierend auf publizierten Algorithmen (Dorostkar et al., 2010). Dazu wurde zunächst von jedem Bild der Laplace-Operator, d. h. die Summe der ungemischten partiellen zweiten Ableitung in den kartesischen X- und Y-Koordinaten, berechnet. Der Schwellenwert zur darauf folgenden Binärisierung wurde als doppelte Standardabweichung der Pixelwerte berechnet. Im resultierenden binären Bild wurden die Massezentren für jeden einzelnen Punkt berechnet und aufaddiert. Abschließend erfolgte eine Normalisierung der Synapsen-Dichtewerte zur Bildfläche, welche zuvor um die von Blutgefäßen oder Zellkörpern eingenommene Fläche bereinigt wurde.

2.4.5.3 Auswertung der Plaque- und Dystrophien-Färbungen

Um amyloide Plaques und assoziierte neuritische Dystrophien mit Phospho-Tau in Tau x APP PS1-Mäusen in Relation zu setzen, wurden die Methoxy-X04-AT8-Doppelfärbungen sowohl zwei- als auch dreidimensional ausgewertet: Mit der Open Source Software ImageJ (Version 1.43u; Wayne Rasband, NIH, USA) wurden Maximumintensitätsprojektionen der Z- Stapel-Einzelkanäle invertiert, ein Default-Schwellenwert gesetzt und die Gesamtflächen gemessen (**Abb. 13**). In ähnlicher Weise wurden mit der Igor Pro Software (Version 6.2.3.3)

nach Schwellenwertsetzung die Plaque- bzw. Dystrophie-Gesamtvolumina aus den Einzelkanälen im Z-Stapel bestimmt.

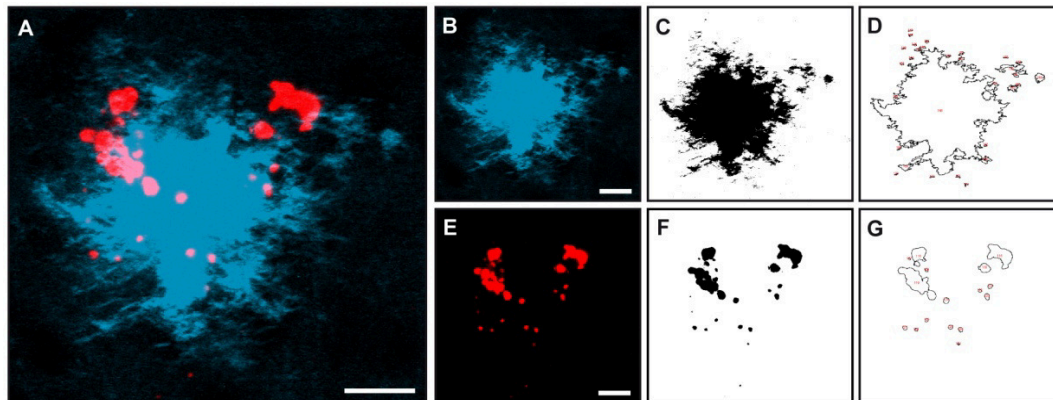


Abb. 13: Zweidimensionale Analyse der Plaque- und Dystrophien-Fläche

A, Methoxy-X04 gefärbter amyloider Plaque (blau), umgeben von Phospho-Tau enthaltenden neuritischen Dystrophien (Antikörper AT8, rot). Maximumintensitätsprojektion eines 50 μm Z-Stapels. **B-G**, Analyse der Plaque- (**B-D**) bzw. Dystrophien-Fläche (**E-G**) mittels Bildkanal-Invertierung und Schwellenwertsetzung (**C, F**) sowie anschließender Einzelflächendetektion von Partikeln ≥ 20 Pixel (**D, G**). Maßstabsbalken: 10 μm .

2.4.6 Färbeprotokolle für die Elektronenmikroskopie

Für elektronenmikroskopische Ultrastrukturanalysen der A β - und Tau-Pathologie in 3xTg-AD x YFP-Mäusen wurden DAB-Einzelfärbungen (Antikörper AT8, **Tab. 9**) sowie DAB- und Immunogold-Doppelfärbungen (Antikörper GFP in Kombination mit AT8 oder 6E10, **Tab. 10**) durchgeführt. Da YFP ursprünglich durch genetische Mutation von GFP erzeugt wurde, werden die sich stark ähnelnden Proteine beide durch den GFP-Antikörper erkannt. Der monoklonale Antikörper 6E10 bindet an ein Epitop innerhalb der Aminosäurereste 3-8 des humanen A β -Proteins und detektiert auch APP.

Tab. 9: Protokoll DAB-Einzelfärbung (AT8)

Vorgang	Dauer	Lösung
Aldehydgruppen-Inaktivierung	20 min	0,37 % Glycin + 0,2 % NaCl in 0,1M PB
Waschen	2 x 5 min	PBS
Gewebe-Aufschluss	10 min	05 % DMSO in PBS
	10 min	10 % DMSO in PBS
	20 min	20 % DMSO in PBS
	20 min	40 % DMSO in PBS
Waschen	3 x 10 min	PBS
Peroxydasen-Inaktivierung	30 min	0,045 % H ₂ O ₂ in PBS
Waschen	3 x 5 min	PBS
Vorinkubation	30 min	5 % NGS + 0,1 % CWFS-Gelatine in PBS
Waschen	5 min	PBS
Primärantikörper-Inkubation	über Nacht	biotinylierter Primärantikörper (AT8) 1:100 in 1 % NGS + 0,5 % BSA + 0,1 % CWFS-Gelatine in PBS
Waschen	6 x 10 min	PBS
ABC-Reaktion	2 h	Vectastain Elite ABC Kit RK-6100: Reagenz A + Reagenz B je 1:200 in PBS; ca. 30 min vor Verwendung ansetzen, vor Licht schützen
Waschen	6 x 10 min	PBS
	3 x 5 min	0,1M Cacodylatpuffer + 5 % Saccharose
Post-Fixierung	10 min	2 % Glutaraldehyd in 0,1M Cacodylatpuffer + 5 % Saccharose
Waschen	3 x 5 min	0,1M Cacodylatpuffer + 5 % Saccharose
	über Nacht	PBS
	3 x 10 min	0,05 M TRIS-Puffer + 7,5 % Saccharose
DAB-Reaktion	ca. 10 min	0,05 % DAB + 0,0015 % H ₂ O ₂ in 0,05M TRIS-Puffer + 7,5 % Saccharose
Waschen	3 x 5 min	0,05 M TRIS-Puffer + 7,5 % Saccharose
	3 x 5 min	PBS
	10 min	0,1 M Cacodylatpuffer + 5 % Saccharose
Osmieren	20 min	0,1 % OsO ₄ in 0,1M Cacodylatpuffer + 5 % Saccharose
Waschen	3 x 10 min	0,1 M Cacodylatpuffer + 5 % Saccharose
	über Nacht	PBS
	10 min	50 % Ethanol
	10 min	70 % Ethanol
	10 min	80 % Ethanol

Dehydrieren	10 min	96 % Ethanol
	3 x 10min	100 % Ethanol
Überführen in Einbettmedium	3 x 10 min	Propylenoxid
Kunstharz-Einbettung	1 h	EMBed-812 : Propylenoxid (1:1)
	über Nacht	EMBed-812 : Propylenoxid (2:1)
	1 h	EMBed-812
	3 Nächte, 55 °C	Flacheinbettung auf Objektträgern

ABC: Avidin-Biotin-Komplex (engl.: avidin-biotin-complex)

CWFS: Kaltwasserfisch-Haut (engl.: cold water fish skin)

DMSO: Dimethylsulfoxid

OsO₄: Osmiumtetroxid

PB: Phosphatpuffer (engl.: phosphate buffer)

TRIS: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Tab. 10: Protokoll DAB- (GFP) und Immunogold- (AT8, 6E10) Doppelfärbung

Vorgang	Dauer	Lösung
Aldehydgruppen-Inaktivierung, Waschen, Gewebe-Aufschluss, Waschen und Peroxydasen-Inaktivierung siehe Tab. 9		
Waschen	3 x 10 min	PBS
Vorinkubation	30 min	5 % NSS + 0,1 % CWFS-Gelatine in PBS
Waschen	5 min	PBS-BSA-c (0,1 % BSA-c + 0,1 % CWFS-Gelatine in PBS)
Primärantikörper-Inkubation	über Nacht	beide Primärantikörper (GFP + biotinylierter AT8 /6E10) in 1 % NSS in PBS-BSA-c
Waschen und Blockieren unspezifischer Bindestellen	6 x 10 min	PBS-BSA-c + 2 % Milchpulver
1. Sekundärantikörper-Inkubation	über Nacht	Streptavidin-Gold in PBS-BSA-c + 2 % Milchpulver
Waschen	6 x 10 min	PBS-BSA-c
	3 x 5 min	PBS
Blockieren unspezifischer Bindestellen	40 min	5 % Biotin in 1 M NaOH
Waschen	3 x 5 min	PBS
	5 min	PBS-BSA-c
2. Sekundärantikörper-Inkubation	1 h	biotinylierter Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen) in PBS-BSA-c + 1 % NSS
Waschen	6 x 10 min	PBS-BSA-c
	3 x 5 min	0,1M Cacodylatpuffer + 5 % Saccharose
Post-Fixierung	10 min	2 % Glutaraldehyd in 0,1M Cacodylatpuffer + 5 % Saccharose

Waschen	3 x 5 min	0,1M Cacodylatpuffer + 5 % Saccharose
	über Nacht	PBS
Vorinkubation	3 x 5 min	deionisiertes Wasser
Silber-Verstärkung	ca. 3 min	HQ Silver Enhancement Kit; im Dunklen inkubieren, Verstärkungszeit ist temperaturabhängig
Waschen	3 x 10 min	deionisiertes Wasser
	3 x 5 min	PBS
ABC-Reaktion	1 h	Vectastain Elite ABC Kit RK-6100: Reagenz A + Reagenz B je 1:200 in PBS; ca. 30 min vor Verwendung ansetzen, vor Licht schützen
Waschen	6 x 10 min	PBS
	3 x 10 min	0,05 M TRIS-Puffer + 7,5 % Saccharose
DAB-Reaktion	ca. 15 min	0,05 % DAB + 0,0015 % H ₂ O ₂ in 0,05M TRIS-Puffer + 7,5 % Saccharose
Waschen	3 x 5 min	0,05 M TRIS-Puffer + 7,5 % Saccharose
	3 x 5 min	PBS
Osmieren	20 min	0,2 % OsO ₄ in PBS
Waschen	3 x 10 min, über Nacht	PBS
Dehydrieren, Überführen in Einbettmedium und Kunstharz-Einbettung siehe Tab. 9		

NSS: normales Schweineserum

Die in Kunstharz eingebetteten Schnitte wurden unter einem Lichtmikroskop analysiert und interessante Regionen, welche neuritische Dystrophien aufwiesen, bei 5-facher Vergrößerung mit einer am Mikroskop angeschlossenen Kamera fotografiert (Mikroskop BX50, Kamera ColorView Illu, Software cell[^]D; Olympus Soft Imaging Solutions, Münster). Die Schnittoberflächen wurden mit Wasser und Alkohol gereinigt, bevor das Umblocken auf mit erwärmtem Kunstharz gefüllte Gelatine kapseln (Pharmapol, Dägeling) erfolgte. Nach Aushärten des Kunstharzes bei 55 °C über Nacht wurden die Blöcke vom Objektträger geschnitten und der gewünschte Gewebeausschnitt zu einer trapezförmigen Pyramide getrimmt, wobei die zuvor erzeugten Fotos bei der Orientierung halfen. Mit einem Ultracut UCT Ultramikrotom wurden zunächst Semidünnschnitte (ca. 0,5 µm Schnittdicke) mit einem selbst erzeugten Glasmesser (Glasmesser-Schneider EM KMR2) angefertigt, dann Ultradünnschnitte (Silberinterferenz, entsprechend ca. 70 nm Schnittdicke) mit einem Diamantmesser (alle Geräte von Leica Microsystems, Wetzlar). Lichtmikroskopische Aufnahmen der mit Methylenblau angefärbten Semidünnschnitte dienten zur Orientierung bei der folgenden elektronenmikroskopischen Analyse der auf Grids (Science Services, München) aufgetragenen Ultradünnschnitte.

Tab. 11: Chemikalien zur Immunhistochemie

Chemikalie	Firma, Sitz
Biotin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BSA (bovines Serumalbumin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BSA-c (10 %)	AURION, Wageningen, Niederlande
Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
CWFS (Cold Water Fish Skin)-Gelatine (40 %)	AURION, Wageningen, Niederlande,
DAB (3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
EMbed-812	Science Services, München
Ethanol absolut	VWR, Ismaning
Glutaraldehyd (25 % in Wasser für Elektronenmikroskopie, hoch rein)	SERVA, Heidelberg
Glycin	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methylenblau	Merck, Darmstadt
Methoxy-X04	Prof. Boris Schmidt, TU Darmstadt
Nanogold-Streptavidin	Nanoprobe; Yaphank, NY, USA
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat-2-Hydrat	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
Natriumhypochloritlösung 12 % Cl	Carl Roth, Karlsruhe
Natronlauge	Riedel-de-Haën, Seelze
Osmiumtetroxid	Paesel + Lorei, Duisburg
Propylenoxid (1,2-Epoxypropan)	Carl Roth, Karlsruhe
D(+)-Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Triton X-100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trizma base	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Wasser, destilliert	Merck Millipore, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (30 %)	Merck, Darmstadt
Xylol	VWR, Ismaning
Zitronensäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Tab. 12: Antikörper, Seren und Kits zur Immunhistochemie

Bezeichnung	hergestellt in	Firma, Sitz	Konzentration
Anti-A β (Klon 6E10), biotinyliert, monoklonal	Maus	Covance; Denver, PA, USA	1:100
Anti-GFP, polyklonal	Kaninchen	Millipore; Billerica, MA, USA	1:600
Anti-NF-L, monoklonal	Kaninchen	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	1:200
Anti-PSD-95, monoklonal	Maus	Synaptic Systems, Göttingen	1:200
Anti-Synapsin1/2, polyklonal	Kaninchen	Synaptic Systems, Göttingen	1:1000
Anti-Synaptophysin, monoklonal	Kaninchen	abcam, Cambridge, UK	1:500
Anti-Tau (Klon AT8), biotinyliert, monoklonal	Maus	Thermo Fisher Scientific; Rockford, IL, USA	1:200
Anti-Tau (Klon AT100), monoklonal	Maus	Thermo Fisher Scientific; Rockford, IL, USA	1:200
Anti-Tau (Klon AT180), biotinyliert, monoklonal	Maus	Thermo Fisher Scientific; Rockford, IL, USA	1:200
Anti-Tau (Klon HT7), biotinyliert, monoklonal	Maus	Thermo Fisher Scientific; Rockford, IL, USA	1:200
Anti-Kaninchen, biotinyliert, polyklonal	Schwein	Dako, Glostrup, Dänemark	1:100
Anti-Kaninchen, Alexa Fluor 647-Konjugat	Ziege	Invitrogen, Karlsruhe	1:200/500
Anti-Maus, Alexa Fluor 647- Konjugat	Ziege	Invitrogen, Karlsruhe	1:500
normales Schweineserum		Dako, Glostrup, Dänemark	
normales Ziegenserum		Dako, Glostrup, Dänemark	
Biotin Blocking Kit		Invitrogen, Karlsruhe	
HQ Silver Enhancement Kit		Nanoprobes; Yaphank, NY, USA	
TSA-Kit (Streptavidin-HRP, Tyramid Alexa Fluor 647)		Invitrogen, Karlsruhe	
Vectastain Elite ABC Kit RK- 6100		Vector Laboratories; Burlingame, USA	

Tab. 13: Pufferlösungen zur Immunhistochemie

0,1 M Phosphatpuffer (PB) 1 l destilliertes Wasser 14,95 g Natriumhydrogenphosphat-2-Hydrat 2,49 g Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat pH 7,4	0,02 M Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) 200 ml 0,1M PB 800 ml destilliertes Wasser 8 g NaCl pH 7,4
0,05 M TRIS-Puffer + 7,5 % Saccharose 1 l destilliertes Wasser 6,05 g Trizma base 75 g D(+)-Saccharose pH 7,2	0,1 M Cacodylatpuffer + 5 % Saccharose 1 l destilliertes Wasser 21,4 g Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat 50 g D(+)-Saccharose pH 7,4

2.4.7 Elektronenmikroskopie

Aufnahmen der Ultradünnschnitte mit immunhistochemischen DAB- bzw. Gold-Färbungen wurden mit einem LIBRA 120 TEM (Carl Zeiss NTS, Oberkochen) mit eingekoppelter hochauflösender 2048 HSC CCD-Digitalkamera (TRS, Feldkirchen) angefertigt unter Verwendung der AnalySIS 5.0 ITEM Software (Olympus Soft Imaging Solutions, Münster).

2.5 Statistische Datenanalyse

Soweit nicht anders deklariert, werden die Ergebnisse als Mittelwerte von Mittelwerten \pm Standardabweichung (SA) angegeben. Gemäß dem zentralen Grenzwertsatz nähern sich diese einer Normalverteilung an, weshalb parametrische Prüfverfahren angewandt wurden: Unterschiede zwischen zwei Versuchsgruppen wurden mit einem ungepaarten t-Test geprüft. Beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA, von engl.: analysis of variance) mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt. Da die Spine-Kopfvolumina eine logarithmische Normalverteilung aufwiesen, wurden in diesem Sonderfall log-transformierte Messwerte getestet. Zeitliche Verläufe der Spine-Dichten werden als lineare Approximation abgebildet. Die Anstiege der Regressionsgeraden wurden mit einem F-Test auf statistische Unterschiede von Null überprüft. Die ermittelten p-Werte geben an, mit welcher Wahrscheinlichkeit (engl.: probability) sich zwei Ereignisse nicht signifikant unterscheiden. Als statistisch signifikant angesehen wurde ein p-Wert kleiner als 0,05 (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

Alle erhobenen Messdaten wurden in Excel-Dateien (Excel 2003, Microsoft, Redmond, WA, USA) erfasst und mit Hilfe der Prism 5.04 Software (GraphPad, San Diego, CA, USA) statistisch ausgewertet und grafisch dargestellt. Zum Zusammenfügen der Abbildungen wurde die Adobe Illustrator CS4 Extended Software (Version 11.0.2, Adobe Systems, San Jose, CA, USA) verwendet.

3. ERGEBNISSE

3.1 Auswirkungen der *MAPT*-Transgenexpression auf die strukturelle Plastizität dendritischer Spines im P301S Tauopathie-Mausmodell

Neurodegenerativen Läsionen in Demenzerkrankungen wie dem Verlust von Synapsen und Nervenzellen liegt zumeist eine hochkomplexe, multifaktorielle Pathogenese zugrunde. In transgenen Tieren können verschiedene derartige Faktoren nachmodelliert werden. Dies ermöglicht eine gezielte Analyse der Rolle einzelner Proteine, wie beispielsweise Tau. Zum besseren Verständnis der synaptischen Pathologie in Tauopathien wurde zunächst ein einfach-transgenes Mausmodell untersucht.

3.1.1 Tau-Pathologie in homozygoten Tau x YFP-Mäusen

In homozygoten Tau P301S-Mäusen führte die Expression humanen Tau-Proteins mit einer FTDP-17-Mutation zu einer früh einsetzenden, schnell fortschreitenden Tau-Pathologie in verschiedenen Gehirnregionen, begleitet von Verhaltensauffälligkeiten und einem ausgeprägten Motorphänotyp: Das von zahlreichen Neuronen exprimierte Transgen (**Abb. 14A-A'**) verursachte eine anormale Phosphorylierung, Fehlverteilung und Aggregation des Tau-Proteins (**Abb. 14B**). Auch in intravitalmikroskopisch zugängigen Bereichen des Kortex fanden sich Tau-Ablagerungen in vielen Zellen (**Abb. 14B'**). Besonders stark betroffen waren jedoch Neuronen im Hirnstamm und Rückenmark, welche fibrilläre Tau-Aggregate enthielten (**Abb. 14D, 24B**). Deren Absterben bedingte motorische Beeinträchtigungen, welche schließlich in einer kompletten Hinterlaufähmung der Mäuse endeten (**Abb. 14E-F**).

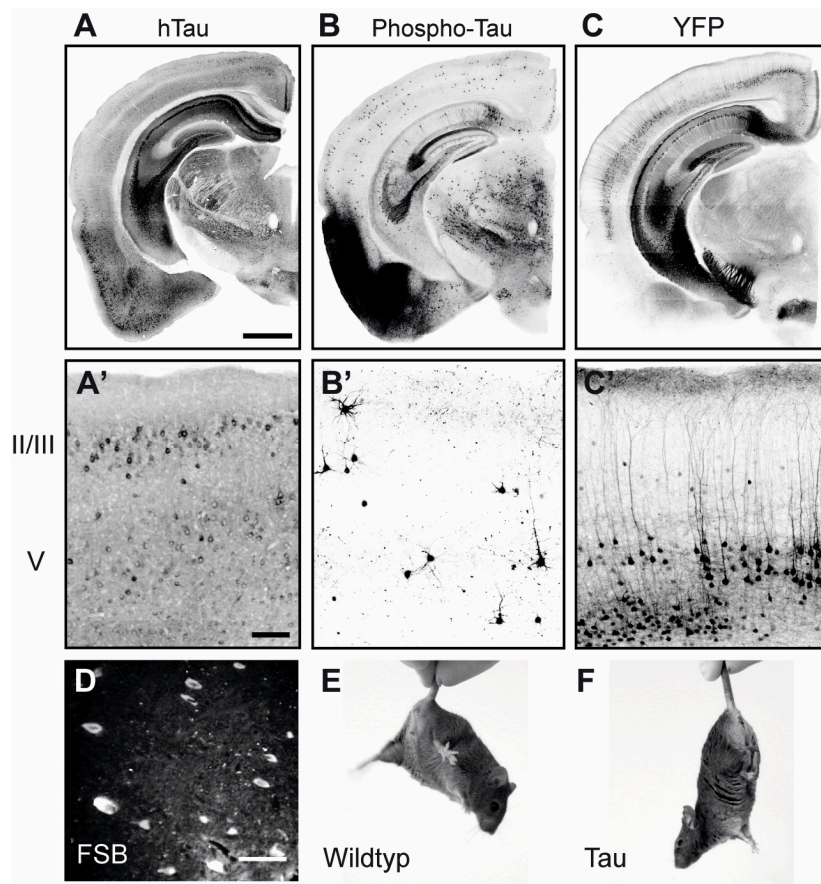


Abb. 14: Histologische Läsionen und Motorphänotyp homozygoter Tau P301S-Mäuse

A-C, Frontalschnitte auf Höhe des visuellen/auditorischen Kortex 5 Monate alter homozygoter Tau x YFP-Mäuse zeigen die *MAPT*-Transgenexpression (Antikörper HT7, **A**), Phospho-Tau (Antikörper AT8, **B**), sowie die *YFP*-Transgenexpression (**C**). **A'-C'**, Detailaufnahmen des visuellen Kortex. Markiert sind die Schichten II/III und V. **D**, Fibrilläres Tau (Farbstoff FSB) im Hirnstamm einer *MAPT*-transgenen Maus. **E-F**, Während Wildtyp-Mäuse beim Anheben am Schwanz die Hinterbeine spreizen, wird bei Tau P301S-Mäusen die Hinterlaufähmung sichtbar. Maßstabsbalken: **A-C** 1 mm; **A'-C'** 100 µm; **D** 50 µm.

3.1.2 Verminderte Spine-Dichte

Um die Effekte kortikaler Tau-Pathologie auf dendritische Spines zu analysieren, wurden männliche Tau P301S-Mäuse mittels Zwei-Photonen-Intravitalmikroskopie untersucht (**Abb. 15A**). Das Tauopathie-Mausmodell wurde zuvor mit der YFP-H Mauslinie verpaart, welche YFP in Subpopulationen kortikaler Neuronen exprimiert, wie z. B. in Pyramidenneuronen der Schichten II/III und V (**Abb. 14C, C'** und **15B**). Somit konnten Spines an Dendritenabschnitten 4 Monate alter homozygoter Tau-Mäuse und gleichaltriger nicht-*MAPT*-transgener (Wildtyp) Mäuse durch ein kraniales Fenster aufgenommen werden (**Abb. 15C-C'**).

Die Spine-Dichten apikaler Dendriten von Schicht V Neuronen zeigten eine starke Streuung, wobei die ermittelten Werte von 0,24 bis 0,60 Spines/ μm in Wildtyp-Mäusen und 0,20 bis 0,60 Spines/ μm in Tau-Mäusen variierten (**Abb. 15D**). Insgesamt wurde eine 17%ige Reduktion der mittleren Spine-Dichte in Tau-Mäusen gemessen ($0,34 \pm 0,04$ vs. $0,41 \pm 0,01$ Spines/ μm in Wildtyp-Mäusen, **Abb. 15E**). Durch Wiederauffinden und repetitives Aufnehmen derselben dendritischen Elemente alle 3-4 Tage über einen Zeitraum von zwei Wochen (**Abb. 15C-C'**) wurde eine weitere Abnahme der Spine-Gesamtzahl in Tau-Mäusen parallel zum Fortschreiten der Tau-Pathologie nachgewiesen: Die relative Spine-Dichte ging auf $0,94 \pm 0,15$ des Anfangswerts zurück, während sie in Wildtyp-Mäusen weitestgehend unverändert blieb ($1,01 \pm 0,13$; **Abb. 15F**).

3.1.3 Beeinträchtigte Spine-Kinetik

Die hochauflösende intravitale Langzeitmikroskopie ermöglicht eine sehr detaillierte Analyse der Spine-Kinetik (**Abb. 15C-C'**): Durch sorgfältiges Verfolgen des Schicksals einzelner dendritischer Spines können die Dichten stabiler, neuer und verlorener Spines für jeden der aufeinanderfolgenden Aufnahmezeitpunkte ermittelt werden. Diese Werte liefern ein messbares Korrelat struktureller synaptischer Plastizität.

In Tau-Mäusen wurde keine signifikante Abweichung in den Dichten persistenter Spines (stabil für mindestens eine Woche; **Abb. 15G**) und verlorener Spines (verschwunden von einem zum nächsten Aufnahme-Zeitpunkt; **Abb. 15H**) gefunden. Während jedoch in Wildtyp-Mäusen der permanente Verlust und Neugewinn von Spines wohlbalanciert war ($0,083 \pm 0,012$ vs. $0,087 \pm 0,015$ Spines/ μm ; **Abb. 15H-I**), wiesen Tau-Mäuse Veränderungen im Spine-Umsatz auf: Die Dichte neuer Spines (hinzugewonnen von einem zum nächsten Zeitpunkt; **Abb. 15I**) war im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen reduziert ($0,058 \pm 0,008$ Spines/ μm). Somit konnte die konstante Abnahme der Spine-Gesamtzahl im Tauopathie-Mausmodell auf eine verminderte Ausbildung neuer Spines zurückgeführt werden.

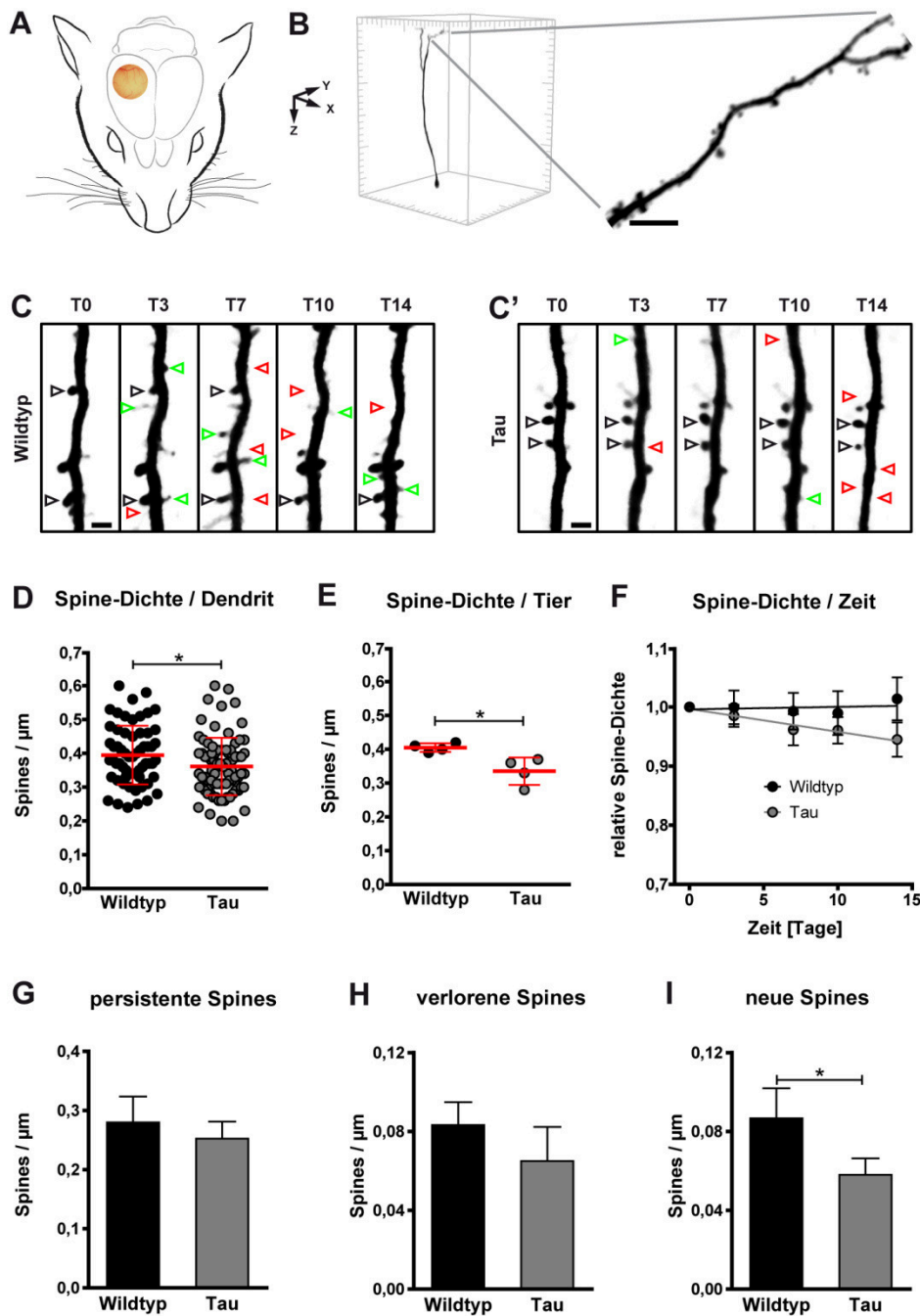


Abb. 15: Spine-Dichte und -Kinetik in Wildtyp- und Tau-Mäusen

A, Platzierung des chronischen kraniellen Glasfensters für die Zwei-Photonen-Intravitalmikroskopie. **B**, Beispiel eines YFP-exprimierenden Schicht V Neurons in einem $425 \times 425 \times 550 \mu\text{m}^3$ XYZ-Bildstapel des somatosensorischen Kortex. Die Vergrößerung zeigt einen parallel zur Gehirnoberfläche verlaufenden Ast des apikalen Dendritenbaums (Maximumintensitätsprojektion; Maßstabsbalken 5 μm). **C-C'**, Serielle Aufnahmen (T: Tag) von Dendritenabschnitten in 4 Monate alten Wildtyp- (**C**) und Tau-Mäusen (**C'**). Stabile, neue und verlorene Spines sind exemplarisch markiert durch schwarze, grüne und rote Pfeilköpfe (Maximumintensitätsprojektionen; Maßstabsbalken: 2 μm). **D-E**, Spine-Dichten pro Dendrit (**D**) bzw. Tier (**E**) in Wildtyp- und Tau-Mäusen am ersten Aufnahme-Zeitpunkt (61-82 Dendriten in 4 Mäusen pro Kohorte; 14-22 Dendriten pro Maus; Mittelwerte \pm SA in rot; ungepaarter t-Test: * $P < 0,05$). **F**, Relative Spine-Dichten im Verlauf des zweiwöchigen

Untersuchungszeitraums, bezogen auf den am ersten Aufnahme-Zeitpunkt ermittelten Messwert (Mittelwerte \pm SAM von 28-41 Dendriten in 3-4 Mäusen pro Kohorte; 8-12 Dendriten pro Maus; lineare Approximation; F-Test der Mittelwerte: ** $P < 0,01$). **G-I**, Dichten persistenter (**G**), verllorener (**H**) und neuer Spines (**I**) (Mittelwerte \pm SA von 3-4 Mäusen pro Kohorte; 28-41 Dendriten pro Kohorte; 8-12 Dendriten pro Maus; ungepaarter t-Test: * $P < 0,05$).

3.1.4 Morphologische Spine-Veränderungen

Da Funktion und Morphologie dendritischer Spines eine enge Wechselbeziehung aufweisen, wurden dreidimensionale Rekonstruktionen der intravitalmikroskopisch aufgenommenen Spines erzeugt (**Abb. 16A-A'**). Ein Vergleich morphologischer Parameter sollte somit Rückschlüsse auf mögliche funktionelle Beeinträchtigungen erlauben. Die Messungen ergaben eine starke Vergrößerung des Spine-Kopfvolumens in Tau-Mäusen ($0,15 \pm 0,05 \mu\text{m}^3$ vs. $0,08 \pm 0,01 \mu\text{m}^3$ in Wildtyp-Mäusen; **Abb. 16B**), begleitet von einem geringeren Anstieg der Spine-Länge ($2,04 \pm 0,14 \mu\text{m}$ vs. $1,69 \pm 0,13 \mu\text{m}$ in Wildtyp-Mäusen; **Abb. 16C**). Zusätzlich wurden die Spines anhand ihrer Länge, Kopf- und Halsweite in die morphologischen Klassen thin, stubby und mushroom unterteilt (**Abb. 16A', D**). In Tau-Mäusen war der prozentuale Anteil der thin Spines deutlich reduziert ($15,39 \pm 10,43 \%$ vs. $28,23 \pm 7,42 \%$ in Wildtyp-Mäusen), bei gleichzeitiger Zunahme der mushroom Spines ($58,63 \pm 16,96 \%$ vs. $39,58 \pm 7,92 \%$ in Wildtyp-Mäusen). Die stubby Spine-Fraktion war hingegen nicht signifikant verändert.

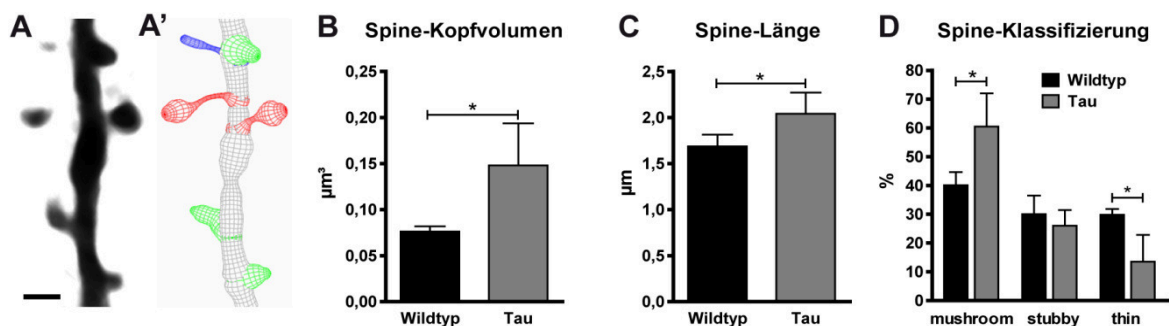


Abb. 16: Spine-Morphologie in Wildtyp-und Tau-Mäusen

A-A', Intravitalmikroskopische Aufnahmen dendritischer Spines (**A**, Maximumintensitätsprojektion) wurden mit Hilfe der Imaris Software rekonstruiert (**A'**, 3D-Drahtmodellldarstellung) und anhand morphologischer Parameter in die Klassen mushroom (rot), stubby (grün) und thin Spines (blau) eingeteilt. Maßstabsbalken: $2 \mu\text{m}$. **B-D**, Spine-Kopfvolumen (**B**), -Länge (**C**), und -Klassifizierung (**D**) von Wildtyp- und Tau-Mäusen (Mittelwerte \pm SA von 3-4 Mäusen; 130-167 Spines an 10 Dendriten pro Kohorte; 32-45 Spines an 2-4 Dendriten pro Maus; ungepaarter t-Test an log-transformierten Messwerten: * $P < 0,05$).

3.1.5 Spine-Pathologie ist unabhängig von Phospho-Tau

Im nächsten Schritt sollte der kausale pathologische Prozess, welcher zu Spine-Veränderungen im Tauopathie-Mausmodell führt, näher untersucht werden. Dazu wurde die Tau-Pathologie YFP-exprimierender Schicht V Pyramidenneuronen, aus deren Population apikale Dendritenabschnitte aufgenommen wurden, immunhistochemisch analysiert.

In den verpaarten Mausmodellen werden sowohl YFP als auch das mutierte humane Tau-Protein unter der Kontrolle des murinen *Thy1*-Promotors exprimiert. Dennoch können die Genexpressionsmuster untereinander stark variieren. Um festzustellen, ob die intravitalmikroskopisch untersuchten YFP-positiven Neuronen auch das *MAPT*-Transgen exprimieren, wurde humanes Tau-Protein in Gehirnschnitten angefärbt (Antikörper HT7; **Abb. 17A**). Ein Abgleich der HT7-Färbung mit der YFP-Expression (**Abb. 17A'**) ergab, dass die meisten YFP-positiven Schicht V Neuronen geringe bis starke zytoplasmatische HT7-Immunoreaktivität zeigten (**Abb. 17A''**).

Homozygote Tau P301S-Mäuse entwickeln bereits im Alter von wenigen Monaten eine schwerwiegende Tauopathie mit zahlreichen Filamenten hyperphosphorylierten Tau-Proteins im zerebralen Kortex (Allen et al., 2002; Hampton et al., 2010). Daher war zu erwarten, dass einige der YFP-exprimierenden Schicht V Neuronen NFT-ähnliche Tau-Aggregate enthielten. Auf der Suche nach einem fluoreszierenden, gehirngängigen Farbstoff zur Detektion dieser Ablagerungen wurde das Amyloid-bindende Kongorot-Derivat FSB getestet. Mit diesem Fluorophor konnten zuvor im selben Mausmodell Tau-Filamente im Rückenmark und in der Retina angefärbt werden (Gasparini et al., 2011; Schön et al., 2012; Velasco et al., 2008). Trotz exakter Nachahmung der veröffentlichten Applikationsmethode war jedoch der Versuch erfolglos, mittels FSB-Injektion intravitalmikroskopisch detektierbare intrazelluläre Tau-Filamente im Kortex zu markieren. Selbst die Verwendung von Tieren im finalen Tauopathie-Stadium sowie eine rostrale Platzierung des Glasfensters über Regionen, in welchen die Pathologie besonders stark ausgeprägt ist, brachten nicht den gewünschten Erfolg. In Gehirnschnitten dieser Tiere wurden hingegen zahlreiche FSB-markierte Zellen im Hirnstamm gefunden (**Abb. 14D**), weshalb methodische Fehler ausgeschlossen werden konnten. Auch durch alternative lokale Applikation des wohl-etablierten Amyloid-bindenden Fluorophors Thioflavin-S (entsprechend De Calignon et al., 2009) ließen sich im Kortex des Tau P301S Mausmodells keine Tau-Fibrillen anfärben. Da die Fluoreszenz-Spektren von YFP und Thioflavin-S stark überlappen, wurden hierzu Tau-Mäuse getestet, welche kein YFP-Transgen trugen.

Aus Ermangelung eines Farbstoffes für intravitalmikroskopische Untersuchungen wurde pathologisches Tau-Protein in fixierten Gehirnschnitten angefärbt. Dabei fand der Phosphoepitop-spezifische Antikörper AT8 Verwendung (**Abb. 17B-B''**). Überraschender

Weise konnte nur in einem verschwindend geringen Anteil YFP-exprimierender Schicht V Pyramidenneuronen AT8-positives Phospho-Tau nachgewiesen werden: In 4 Monate alten Tau-Mäusen waren $0,12 \pm 0,13$ % der Neuronen positiv für YFP und AT8 (d. h. 3 von 2433 Zellen, **Abb. 17C**; außerdem exprimierten 19 AT8-positive Schicht V Neuronen kein YFP). Selbst in 6 Monate alten Tau-Mäusen mit maximaler Pathologie stieg der Anteil YFP- und AT8-positiver Neuronen nur auf $1,69 \pm 2,87$ % (entsprechend 34 von 1983 Zellen, **Abb. 17D**; außerdem exprimierten 146 AT8-positive Schicht V Neuronen kein YFP). Dies legte die Schlussfolgerung nahe, dass die intravitalmikroskopisch analysierten Neuronen mit hoher Wahrscheinlichkeit keine somatodendritischen Phospho-Tau-Aggregate enthielten, welche die beobachteten Spine-Veränderungen verursachten.

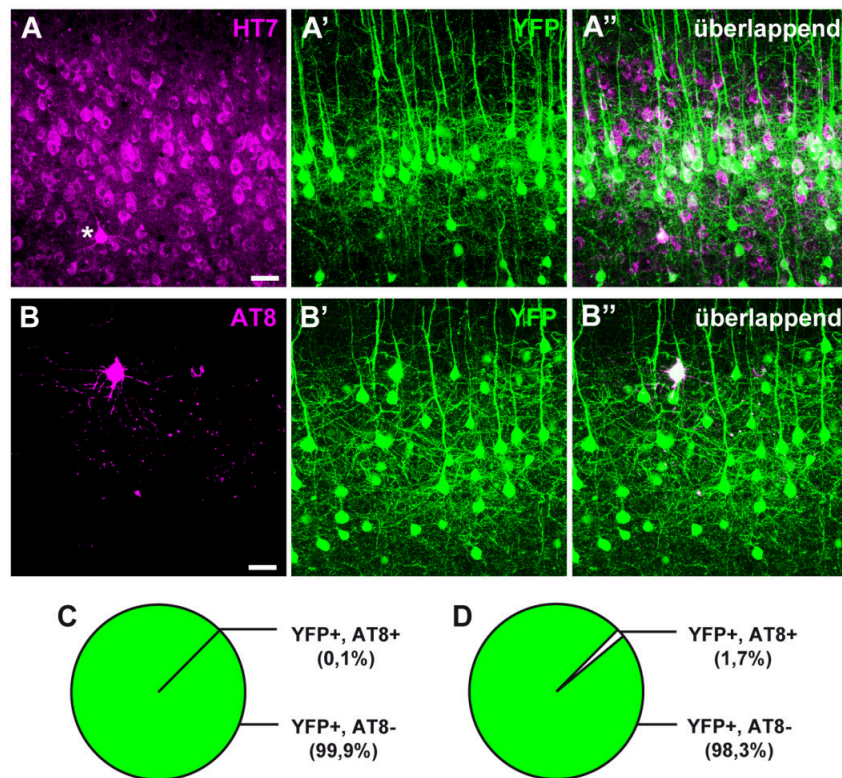


Abb. 17: (Phospho-)Tau in YFP-exprimierenden Neuronen

A-A'', Immunhistochemische Färbung humanen Tau-Proteins (Antikörper HT7; magenta; **A**) im visuellen Kortex einer 4 Monate alten Tau x YFP Maus. Der Stern markiert eine mit somatodendritischen Tau-Aggregaten gefüllte Zelle. YFP-positive Schicht V Pyramidenneuronen (grün; **A'**), welche das *MAPT*-Transgen exprimieren, zeigen weiße Zytosolfärbung im überlappenden Bild (**A''**). **B-B''**, Anfärbung von Phospho-Tau (Antikörper AT8; magenta; **B**) in einem konsekutiven Schnitt. **C-D**, Kuchendiagramme der Fraktionen YFP-exprimierender (YFP+) Schicht V Neuronen mit (AT8+) oder frei von (AT8-) Phospho-Tau in 4 (**C**) und 6 Monate alten (**D**) Tau-Mäusen (Mittelwerte von 5-6 Mäusen pro Kohorte; 1983-2433 Zellen in $0,32$ - $0,39$ mm³ Gewebe). **A-A''** und **B-B''** zeigen Maximumintensitätsprojektionen von 50 μ m Z-Stapeln. Maßstabsbalken: 50 μ m.

3.1.6 Tau-Nachweis in dendritischen Spines

Kürzlich wurde gezeigt, dass die Fehlverteilung hyperphosphorylierten Tau-Proteins in dendritische Spines synaptische Beeinträchtigungen hervorruft (Hoover et al., 2010). Daher sollte das Protein nun mittels Phosphoepitop-spezifischer Antikörper (AT8, AT100 und AT180) in Spines kortikaler Pyramidenneuronen der Tau-Mäuse nachgewiesen werden (**Abb. 18**). AT8-immunoreaktives Phospho-Tau fand sich häufig in Neuropilfäden und neuritischen Dystrophien sowie im somatodendritischen und axonalen Kompartiment einiger Neuronen, jedoch niemals in dendritischen Spines (**Abb. 18A-C'''**). Die vergleichsweise spärlichen AT100- und AT180-Färbungen waren noch stärker begrenzt auf das Zellsoma und den proximalen Dendritenschaft (**Abb. 18D-E**). Nur in sehr wenigen Fällen zeigten distale Dendritenäste höherer Ordnung ein getüpfeltes AT100-Färbungsmuster (**Abb. 18F**).

Um eine herabgesetzte Antikörper-Bindungskapazität durch Ansammlungen des YFP-Proteins im postsynaptischen Kompartiment auszuschließen, wurden gezielt YFP-exprimierende sowie -negative Zellen analysiert. Auch nach Anwendung einer alternativen Gewebe-Fixierungsmethode mittels Bouin-Lösung, welche die Tau-Detektion verbessern soll (Kremer et al., 2011), konnte kein eindeutiger immunhistochemischer Nachweis des Proteins in kortikalen Spines erbracht werden. Ebenso erfolglos waren DAB-Färbungen an konventionellen Paraffin-eingebetteten Hirnschnitten. Durch deren geringe Dicke von ca. 4 µm konnten jedoch mögliche Beeinträchtigungen der Antikörper-Penetration in den mit 70 µm vielfach dickeren Vibratomschnitten umgangen werden.

Der Einsatz Enzym-vermittelter Antikörper-Detektion erzeugt eine mehrfache Signalverstärkung, wodurch die Tau-Lokalisierung selbst in sehr feinen Strukturen wie Axonen oder dünnen Dendritenästen ermöglicht wurde (**Abb. 18C', C'''**). Außerdem wurde bei der Untersuchung anderer Gehirnregionen wie CA3 im Hippocampus (**Abb. 18G-J**) AT8-immunoreaktives Phospho-Tau in neuronalen Spine-ähnlichen Ausstülpungen gefunden (Vergrößerung **Abb. 18G**). Die AT100- und AT180-Färbungen waren auch hier schwächer ausgeprägt (**Abb. 18H-J**), ähnlich dem beschriebenen kortikalen Muster. Zusammenfassend schienen methodische Restriktionen der Tau-Detektion eher zweitrangig zu sein. Vielmehr sollten Gehirnregions- und Neuronenpopulations-spezifische Unterschiede in der Tau-(Fehl-) Verteilung berücksichtigt werden, welche möglicher Weise auf distinkten pathologischen Mechanismen beruhen.

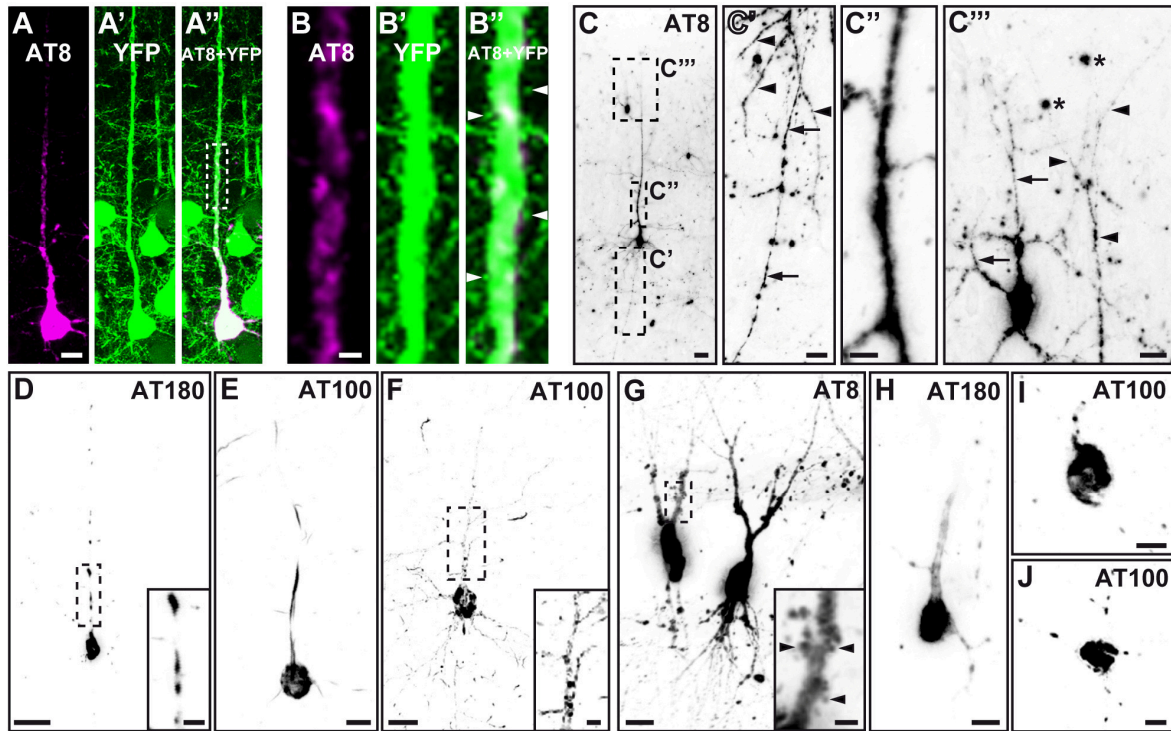


Abb. 18: Kein Phospho-Tau in kortikalen dendritischen Spines

Immunhistochemische Färbungen hyperphosphorylierten Tau-Proteins (Antikörper AT8, AT100 und AT180) in kortikalen Schicht V Pyramidenneuronen (**A-F**) und hippocampalen CA3 Neuronen (**G-J**). **A-A''**, YFP-exprimierendes Neuron, gefüllt mit somatodendritischem AT8-immunoreaktivem Phospho-Tau. **B-B''**, Vergrößerung des in **A''** durch ein gestricheltes Rechteck gekennzeichneten apikalen Dendritenabschnitts. Die vom Schaft herausragenden YFP-positiven dendritischen Spines (exemplarisch markiert durch Pfeilköpfe in **B''**) enthalten kein Phospho-Tau. **C**, Beispiel eines YFP-negativen Schicht V Neurons (**C'-C''**, Vergrößerungen der durch gestrichelte Rechtecke markierten Regionen) mit AT8-immunoreaktivem Phospho-Tau im Soma, Axon (Pfeile in **C'**), basalen Dendriten (Pfeilköpfe in **C'**), apikalen Dendritenschaft (**C''**) und in distalen dendritischen Ästen höherer Ordnung (Pfeilköpfe in **C'''**). Ein benachbartes AT8-positives Schicht II/III Neuron weist in seinem Dendritenbaum ein ähnliches getüpfeltes Phospho-Tau Färbemuster auf (Pfeile in **C'''**) – nicht zu verwechseln mit herausragenden Spines. Auch im Neuropil fand sich gelegentlich AT8-positives Phospho-Tau, zum Beispiel in neuritischen Dystrophien (Asterisken in **C'''**). Anders als im Kortex konnte in den Spine-ähnlichen Ausstülpungen der hippocampalen CA3-Neuronen sehr häufig Phospho-Tau nachgewiesen werden (Vergrößerung in **G**, Pfeile). Dargestellt sind Maximum-intensitätsprojektionen. Die Aufnahmen **C-J** wurden zur Kontrastverstärkung invertiert. Maßstabsbalken: **B** 2 µm; **C''** & Vergrößerungen in **D**, **F-G** 5 µm; **A**, **C'**, **C'''**, **E**, **H-J** 10 µm; **C**, **D**, **F-G** 20 µm.

3.1.7 Intravitalmikroskopie axonaler Boutons

Da Tau als Mikrotubuli-assoziiertes Protein primär im Axon lokalisiert ist, war eine Untersuchung axonaler Pathologie im Tauopathie-Mausmodell von besonderem Interesse. Generell ist es möglich, entsprechend der Analyse von Dendritenabschnitten in Mäusen der YFP-H Linie auch das Schicksal der deutlich dünneren Axone intravitalmikroskopisch zu verfolgen und beispielsweise die Dichte, Größe und Umsatzrate axonaler Boutons auszuwerten (**Abb. 19**):

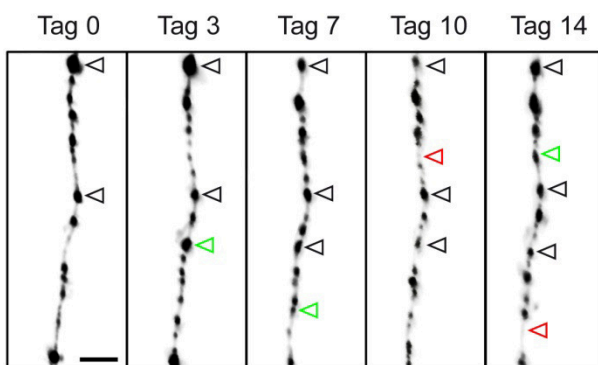


Abb. 19: Zeitserie axonaler Boutons

Maximumintensitätsprojektionen eines YFP-positiven Axons in der kortikalen Schicht I/II, welches über einen Zeitraum von 2 Wochen alle 3-4 Tage aufgenommen wurde. Die Pfeilköpfe markieren beispielhaft an aufeinanderfolgenden Zeitpunkten stabile (schwarz), verlorene (rot) und neu entstandene axonale Boutons (grün). Maßstabsbalken: 5 µm.

Ein derartiger Versuchsansatz in Tau x YFP-Mäusen wurde jedoch durch methodische Hindernisse erschwert: Zum einen konnten im relativ dichten Netz YFP-exprimierender Neuriten in den oberflächlichen kortikalen Schichten nur sehr selten isolierte Axonabschnitte aufgefunden werden. Ein Zurückverfolgen dieser Axone zu ihrem Ursprung – oftmals in der anderen Gehirnhemisphäre – und somit deren Identifizierung bzw. Charakterisierung war nicht möglich. Zudem erforderte die im Vergleich zu den mehrfach dickeren Dendritenästen deutlich geringere axonale YFP-Fluoreszenz eine Erhöhung der Laser-Intensität. Dies verstärkte die Gefahr, die sehr feinen axonalen Strukturen durch Phototoxizität zu schädigen. Schließlich konnte auch die äußerst relevante Fragestellung nach der zeitlichen Abfolge synaptischer Degeneration (Ist der Verlust dendritischer Spines ein Primärereignis oder Folgeerscheinung präsynaptischer Pathologie?) nicht adressiert werden. Die dafür notwendige eindeutige Zuordnung YFP-positiver präsynaptischer Boutons zu eine funktionelle Einheit bildenden postsynaptischen Spines war nicht umsetzbar. Daher wurden im Folgenden – ergänzend zur intravitalmikroskopischen Untersuchung kortikaler dendritischer Spines – Prä- und Postsynapsendichte-Analysen an immunhistochemisch gefärbten Gehirnschnitten durchgeführt.

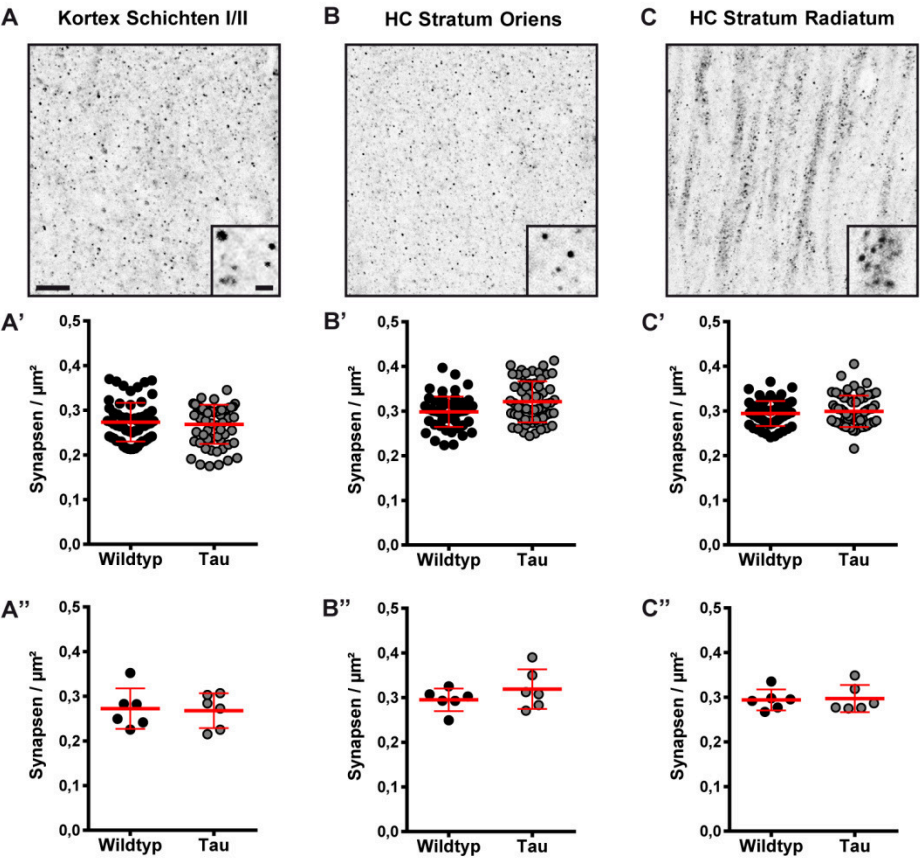
3.1.8 Gehirnschnitt-Analyse prä- und postsynaptischer Spezialisierungen

Um den Einfluss der Tau-Pathologie auf die Synapsendichten nicht nur einzelner Neuronen sondern größerer Gehirnbereiche zu untersuchen, wurden PSD-95-Antikörper zur Detektion exzitatorischer Postsynapsen (bzw. dendritischer Spines) verwendet sowie Synapsin1/2-Antikörper zur Detektion exzitatorischer und inhibitorischer Präsynapsen (**Abb. 20**). Analysiert wurden zum einen die kortikalen Schichten I/II, in welchen sich auch die zuvor intravitalmikroskopisch untersuchten apikalen Dendriten der Schicht V Pyramidenneuronen befinden. Zur Aufdeckung möglicher regionaler Pathologie-Unterschiede wurden außerdem die Synapsendichten in Stratum Oriens und Stratum Radiatum der Hippocampusformation bestimmt.

Ein Vergleich 6 Monate alter homozygoter Tau-Mäuse mit gleichaltrigen Wildtyp-Mäusen zeigte keine signifikanten Unterschiede in den Dichten prä- und postsynaptischer Marker (**Abb. 20**). Auch bei jüngeren, 4 Monate alten Tieren konnte mit dieser Methode kein Effekt der *MAPT*-Transgenexpression auf die Synapsendichten gemessen werden (nicht dargestellt). Die Mittelwerte unterschieden sich nicht innerhalb der drei Regionen, aber zwischen den verschiedenen Färbungen: So waren die Dichten Synapsin1/2-immunoreaktiver Präsynapsen, welche sowohl exzitatorische als auch inhibitorische Synapsen erfassen, erwartungsgemäß deutlich höher (ca. 0,61-0,70 Synapsen/ μm^2 , **Abb. 20D-F'**) als die Dichten der auf exzitatorische Postsynapsen begrenzten PSD-95-positiven Spezialisierungen (ca. 0,27-0,32 Synapsen/ μm^2 , **Abb. 20A-C'**).

Um die Vergleichbarkeit mit den intravitalmikroskopischen Befunden zu gewährleisten, wurde die Synapsendichte-Analyse an Gehirnschnitten YFP-exprimierender Mäuse durchgeführt. Dies führte jedoch zu methodischen Schwierigkeiten beim immunhistochemischen Markieren exzitatorischer Postsynapsen: PSD-95-immunoreaktive Spezialisierungen waren fast niemals kolokalisiert mit dendritischen Spines YFP-exprimierender Neuronen (**Abb. 21A-A'**). Somit ist davon auszugehen, dass die Messwerte die tatsächliche Postsynapsendichte unterschätzen (um den Anteil YFP-positiver Spines). Außerdem war eine hohe Streuung der PSD-95-Dichtewerte zu erwarten, in Abhängigkeit von der selbst zwischen Wurfgeschwistern teilweise stark differierenden Dichte YFP-exprimierender Neuronen. Ein stichprobenartiger Vergleich einzelner extremer PSD-95-Dichtewerte mit der YFP-Expressionsdichte im Detektionsfeld zeigte jedoch keine offensichtliche Korrelation der beiden Parameter. Die Streuung der PSD-95-Messwerte befand sich zudem in einem mit der Synapsin1/2-Färbung vergleichbaren Größenbereich.

PSD95



Synapsin 1/2

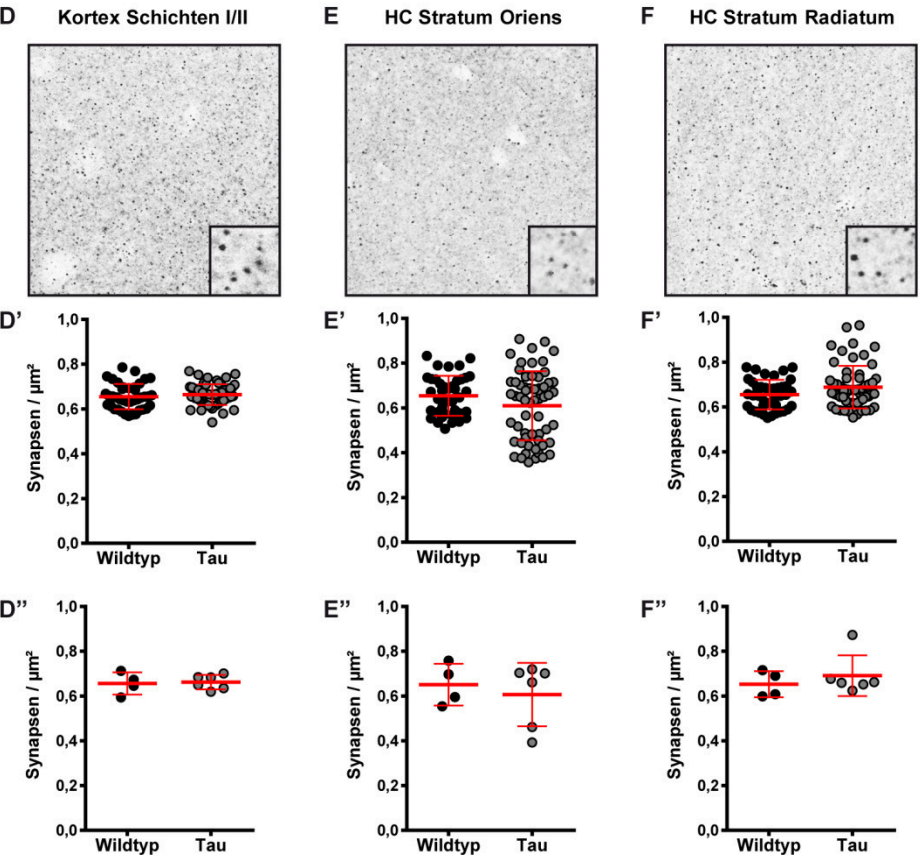
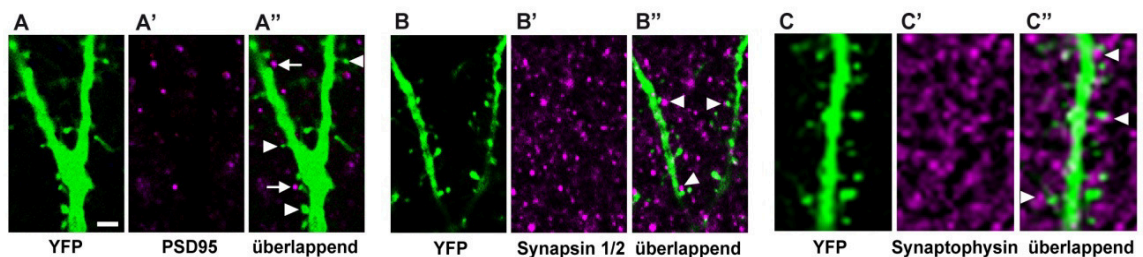


Abb. 20 (S.70): Synapsendichten in Kortex und Hippocampus: PSD-95 und Synapsin1/2

Immunhistochemische Färbungen exzitatorischer Postsynapsen (Antikörper PSD-95, **A-C**) und präsynaptischer Spezialisierungen (Antikörper Synapsin1/2, **D-F**) in den Schichten I/II des visuellen Kortex (**A, D**) und in den hippocampalen Regionen Stratum Oriens (**B, E**) und Stratum Radiatum (**C, F**). Die Abbildungen zeigen Beispiele der Detektionsfelder sowie Detailvergrößerungen. Maßstabsbalken: 10 μm , Vergrößerungen 2 μm . Grafisch dargestellt sind einzelne Synapsendichtemesswerte (**A'-C'**: PSD-95, 60 Detektionsfelder pro Kohorte; **D'-F'**: Synapsin1/2, 40-60 Detektionsfelder pro Kohorte) für 6 Monate alte homozygote Tau-Mäuse und gleichaltrige Wildtyp-Mäuse sowie die Mittelwerte pro Tier (**A''-C''**: PSD-95, 6 Mäuse pro Kohorte; **D''-F''**: Synapsin1/2, 4-6 Mäuse pro Kohorte). Mittelwerte \pm SA in rot.

Derartige technische Probleme traten nicht bei präsynaptischen Färbungen mittels Synapsin1/2-Antikörpern auf (**Abb. 21B-B''**): Wie zu erwarten befand sich fast immer in unmittelbarer Nachbarschaft zu dendritischen Spines YFP-exprimierender Neuronen mindestens eine Synapsin1/2-immunoreaktive Spezialisierung. Ein ähnliches, wenngleich weniger punktuell definiertes Färbungsmuster ergab auch die Präsynapsenmarkierung mit Synaptophysin-Antikörpern, welche zur Absicherung der Synapsin1/2-Befunde zusätzlich durchgeführt wurde (**Abb. 21C-C''**).

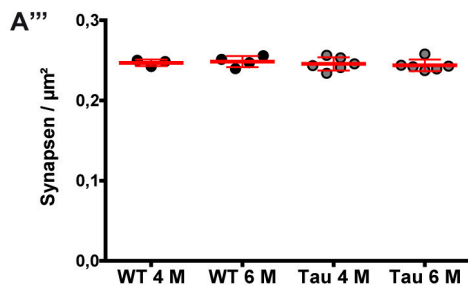
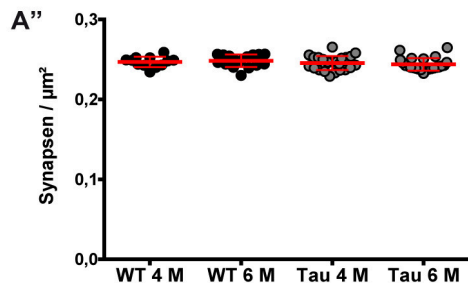
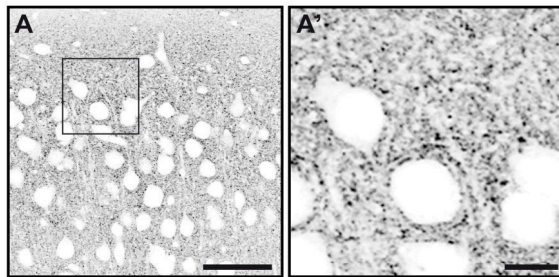
**Abb. 21: Evaluierung der PSD-95-, Synapsin1/2- und Synaptophysin-Färbungen**

Lokalisierung PSD-95- (**A'**), Synapsin1/2- (**B'**) und Synaptophysin-immunoreaktiver (**C'**) synaptischer Spezialisierungen in Relation zu Dendritenabschnitten YFP-exprimierender kortikaler Neuronen (**A, B, C**). PSD-95-immunoreaktive Spezialisierungen wurden nur in der Nähe (Pfeile in **A''**), jedoch nie innerhalb YFP-positiver Spines (Pfeilköpfe in **A''**) gefunden. Hingegen grenzten fast immer Synapsin1/2- bzw. Synaptophysin- immunoreaktive Spezialisierungen direkt an YFP-positive Spines (Pfeilköpfe in **B''**, **C''**). Maßstabsbalken: 2 μm .

Synaptophysin-Dichtemessungen bestätigten, dass sich die Präsynapsendichte in den Tau-Mäusen nicht signifikant von Wildtyp-Mäusen unterschied. Dazu wurden – unter Abwandlung des oben beschriebenen Versuchsansatzes – größere Detektionsfelder im visuellen und (besonders starke Tau-Pathologie aufweisenden) entorhinalen Kortex 4 und 6 Wochen alter Kohorten analysiert (**Abb. 22**). Im visuellen Kortex betrug die durchschnittliche Dichte 0,24-0,25 (**Abb. 22A'''**), im entorhinalen Kortex 0,22-0,24 Synapsen/ μm^2 (**Abb. 22B'''**). Diese im Vergleich zur Synapsin1/2-Färbung (**Abb. 20 D-F**) wesentlich niedrigeren

Werte wurden zum einen bedingt durch die Verwendung eines an die speziell strukturierte Synaptophysin-Färbung angepassten Auswertalgorithmus. Außerdem unterschieden sich die Detektionsfelder in Größe und Subregion, weshalb eine Vergleichbarkeit der absoluten Werte nicht gewährleistet ist.

Visueller Kortex Schicht I/II



Entorhinaler Kortex

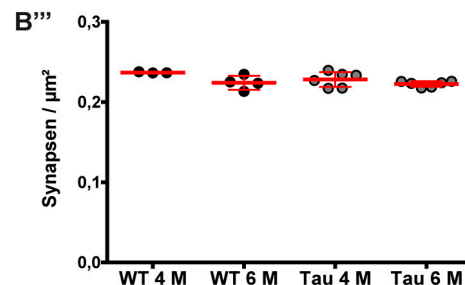
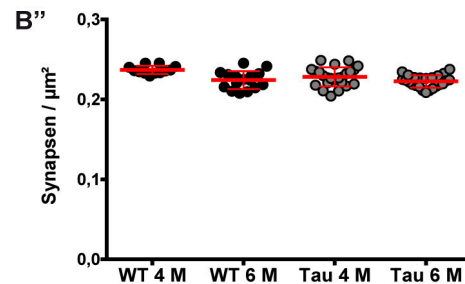
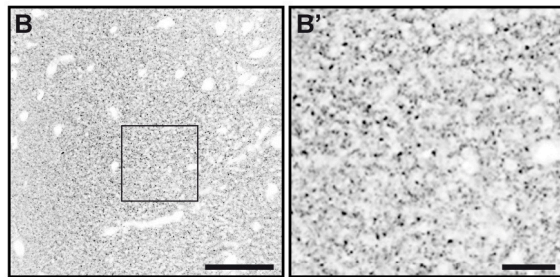


Abb. 22: Präsynapsendichten im visuellen und entorhinalen Kortex: Synaptophysin

Immunhistochemische Färbungen präsynaptischer Spezialisierungen (Antikörper Synaptophysin) in den Schichten I/II des visuellen Kortex (**A-A'**) und im entorhinalen Kortex (**B-B'**). Die Abbildungen zeigen Beispiele der Detektionsfelder (**A, B**) sowie Detailvergrößerungen der markierten Bereiche (**A', B'**). Maßstabsbalken: 50 μm , Vergrößerungen 10 μm . Einzelne Synapsendichte-Messwerte (**A'', B''**; 12-24 Detektionsfelder pro Kohorte) für 4 und 6 Monate (M) alte Tau-Mäuse und gleichaltrige Wildtyp-Mäuse (WT) sowie die Mittelwerte pro Tier (**A''', B'''**; 3-6 Mäuse pro Kohorte) sind dargestellt. Mittelwerte \pm SA in rot.

3.1.9 Kortikaler Neuronenverlust

Homozygote Tau P301S-Mäuse zeigen altersabhängige Neurodegeneration – insbesondere im Hirnstamm (Allen et al., 2002), aber auch in oberen Schichten des Neokortex (Hampton et al., 2010). Daher sollte intravitalmikroskopisch untersucht werden, ob und in welchem Ausmaß YFP-exprimierende Neuronen im visuellen/somatosensorischen Kortex absterben. Hierzu wurden Schicht II/III Neuronen in bis zu 300 µm Tiefe so lange wöchentlich aufgenommen, bis eine Verschlechterung der Fensterqualität oder Hinterlaufparaparese der Tau-Mäuse einen Abbruch des Experiments bedingten (**Abb. 23**). Somit wurde das Schicksal von insgesamt 784 Neuronen in 17 Tau- und Wildtyp-Mäusen über 14-100 Tage verfolgt (**Tab. 14**). Dabei konnte jedoch der Verlust keines einzigen Neurons nachgewiesen werden.

Da die kortikale Pathologie im Tau P301S Mausmodell nach rostral graduell zunimmt, wurde außerdem einer 4,5 Monate alten homozygoten sowie einer 12 Monate alten heterozygoten Tau-Maus ein frontales Fenster über dem Motorkortex implantiert. Aufgrund relativ geringer YFP-Expression konnten hier nur insgesamt 26 Schicht II/III Neuronen über einen Zeitraum von 14-45 Tagen verfolgt werden. Auch in dieser Region verschwand kein Neuron.

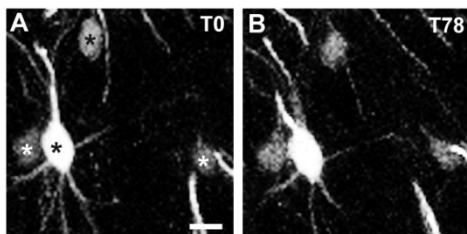


Abb. 23: Intravitalmikroskopie neuronaler Somata

Repetitive Aufnahmen YFP-exprimierender Schicht II/III Neuronen zeigen, dass über einen Zeitraum von 2,5 Monaten (T: Tag) keines der 4 Somata (Asterisks in **A**) verschwindet (**B**). Maximumintensitätsprojektionen von 60 µm Z-Stapeln. Maßstabsbalken: 10 µm.

Tab. 14: YFP-exprimierende Schicht II/III Neuronen

Genotyp, Alter (# Mäuse)	# Schicht II/III Neuronen	# verlorene Neuronen	Zeitraum [Tage]
YFP-H, 4 / 12 Monate (6)	217	0	14-100
Tau (+/+) x YFP-H, 4 Monate (5)	199	0	14-43
Tau (+/-) x YFP-H, 8 Monate (4)	157	0	14-78
Tau (+/-) x YFP-H, 12 Monate (2)	211	0	40-42

(+/-): Homozygotie; (+/-): Heterozygotie

3.2 Auswirkungen modifizierter Fraktalkinrezeptor-Expression auf die kortikale Tau-Pathologie im P301S Tauopathie-Mausmodell

Verpaaren des Tau P301S-Mausmodells mit der CXCR-Mauslinie ermöglicht nicht nur eine morphologische Markierung der Mikrogliazellen mittels EGFP (**Abb. 24A-A'**), sondern vielmehr deren selektive Modifizierung: Durch verminderte Expression bzw. komplette Deletion des Fraktalkinrezeptors CX₃CR1 kann in die Kommunikation zwischen Neuronen und Mikrogliazellen eingegriffen werden. Welche Auswirkungen dies auf die kortikale Tau-Pathologie hat, sollte im Folgenden immunhistochemisch an Gehirnschnitten 12 Monate alter Tau-heterozygoter sowie 5-6 Monate alter Tau-homozygoter Tau x CXCR-Mäuse untersucht werden.

Vor der Gewebeentnahme wurde der Paraparese-Status der Tiere überprüft. Alle Tau-homozygoten Mäuse wiesen starke Muskelschwäche und Hinterlaufähmungen auf. Bei Tau-heterozygoten Mäusen war der Motorphänotyp schwächer ausgeprägt. Fraktalkinrezeptor-abhängige Effekte konnten hierbei nicht festgestellt werden.

Zur Quantifizierung der Tau-Pathologie wurde die Dichte Phospho-Tau (Antikörper AT8) enthaltender Zellen im visuellen und auditorischen Kortex *MAPT*-transgener Mäuse in Abhängigkeit von der Fraktalkinrezeptor-Expression (*Cx3cr1*-Wildtyp/-Heterozygotie/-Knockout bzw. CXCR Wt/(+/-)/(-/-)) bestimmt. Die kortikale Tau-Pathologie nahm von rostral nach caudal graduell ab (**Abb. 24B, C**). Daher wurde bei der Analyse besonders darauf geachtet, stets dieselbe Gehirnregion zu untersuchen (ca. 2,4 mm caudal des Bregma). Im Kortex 12 Monate alter CXCR Wt, (+/-) oder (-/-) Mäuse ohne *MAPT*-Transgen wurden keine AT8-positiven Zellen gefunden. Somit konnte ein Einfluss einer langzeitigen Reduktion bzw. Deletion des Fraktalkinrezeptors auf die Tau-Phosphorylierung ausgeschlossen werden. Es wurden außerdem keine signifikanten Geschlechtsunterschiede bezüglich der Tau-Pathologie oder Fraktalkinrezeptor-abhängiger Effekte gemessen. In die Analyse homozygoter Tau-Mäuse wurden deshalb gleichmäßig gemischte Kohorten aus sowohl männlichen als auch weiblichen Tiere einbezogen. Die heterozygoten Tau-Mäuse waren alle weiblich.

In 12 Monate alten Tau-heterozygoten Mäusen (CXCR Wt) wurden $9,9 \pm 7,6$ AT8-positive Zellen / mm³ gefunden (**Abb. 24D, G**). Fraktalkinrezeptor-Knockout führte zu einer Halbierung der Zelldichte ($4,9 \pm 4,2$ mm⁻³; **Abb. 24F, G**). Aufgrund der hohen Streuung der Messwerte war dieser Unterschied jedoch nicht signifikant. Fraktalkinrezeptor-Heterozygotie zeigte keinen Effekt auf die Tau-Pathologie (**Abb. 24E, G**). Ein ähnlicher Trend zeichnete sich in 5-6 Monate alten Tau-homozygoten Mäusen ab: CXCR Wt Mäuse wiesen eine hohe Dichte AT8-positiver Zellen auf ($16,6 \pm 9,5$ mm⁻³; **Abb. 24H, K**). In positiver Korrelation zur

Fraktalkinrezeptor-Expression war dieser Wert in CXCR (+/-) und (-/-) Mäusen vermindert (**Abb. 24I-K**): Fraktalkinrezeptor-Knockout bewirkte eine über 40 %ige Reduktion Phospho-Tau enthaltender Zellen ($9,4 \pm 5,0 \text{ mm}^{-3}$), während heterozygote Tiere eine intermediäre Zelldichte aufwiesen ($11,9 \pm 5,1 \text{ mm}^{-3}$). Auch innerhalb dieser Kohorten streuten die Messwerte derart stark, dass die Unterschiede zwischen den Kohorten keine statistische Signifikanz erreichten. Auswertungen AT8-positiver Zellen in den Retinas der Tiere unterstützten zusätzlich den Befund, dass sich eine Verminderung der Fraktalkinrezeptor-Expression tendenziell positiv auf die Tau-Pathologie auswirkte.

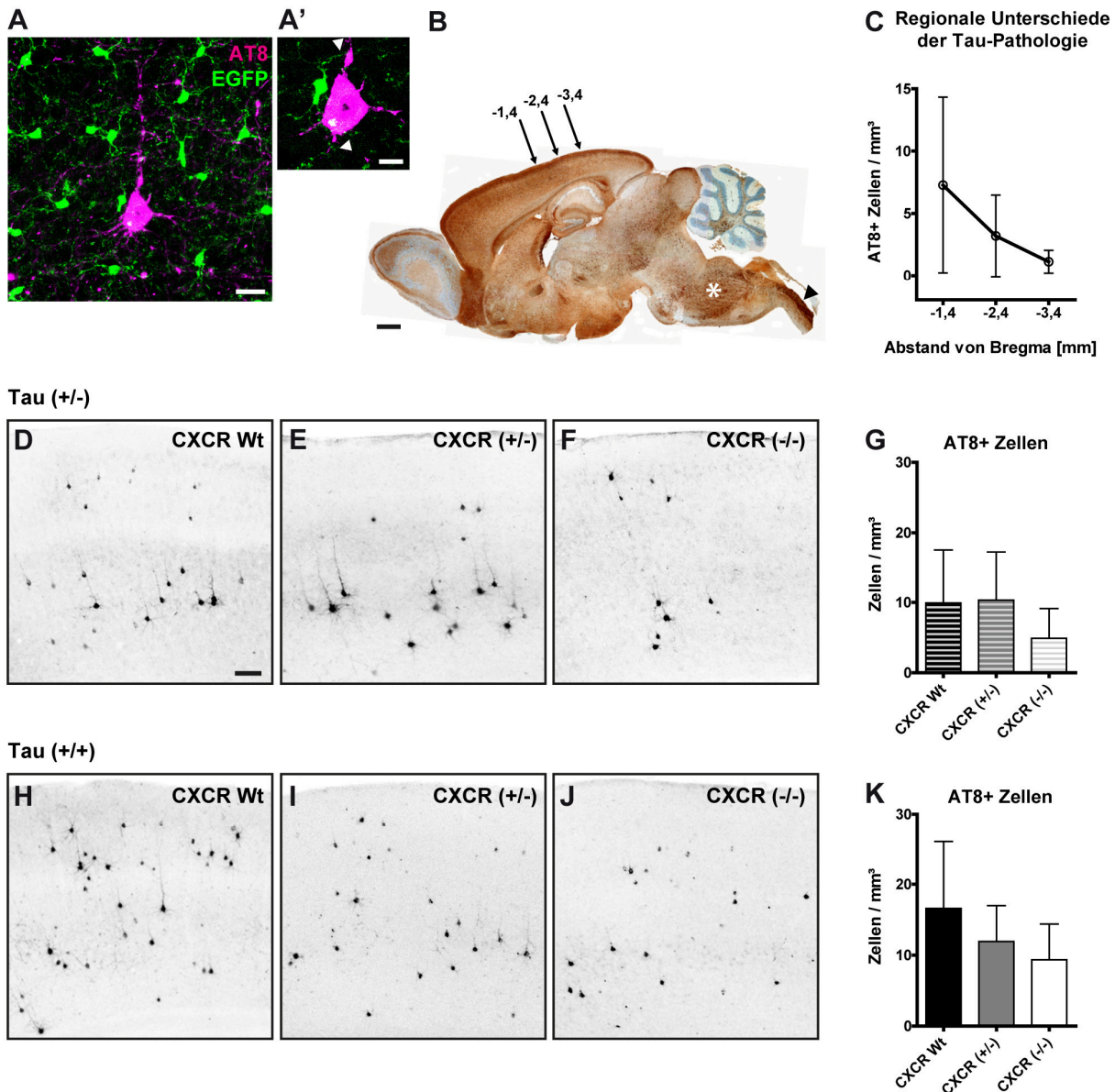


Abb. 24: Kortikale Tau-Pathologie in Abhängigkeit der Fraktalkinrezeptor-Expression

A, Phospho-Tau (Antikörper AT8, magenta) enthaltendes Pyramidenneuron im Kortex einer *MAPT*-transgenen Maus, umgeben von EGFP-exprimierenden Mikrogliazellen (grün). **A'**, In der Vergrößerung sind die feinen Prozesse der Mikrogliazellen zu erkennen, von denen einige im Kontakt mit dem Neuron stehen (Pfeile). **B**, Sagittalschnitt durch das Gehirn einer 12 Monate alten Tau-heterozygoten Tau x CXCR-Maus mit DAB-gefärbtem Phospho-Tau (Antikörper AT8, braun; Hämatoxylin-Färbung von Zellkernen in blau). Pfeile markieren die Regionen 1,4-3,4 mm caudal des Bregma. Asterisk: Hirnstamm; Pfeilkopf: Rückenmark. **C**, Dichtemessungen AT8-positiver Zellen in drei verschiedenen kortikalen Regionen (siehe Markierung in **B**) in 12 Monate alten Tau-heterozygoten Tau x CXCR-Mäusen mit Fraktalkinrezeptor (CXCR)-Knockout. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SA von 4 Mäusen; 3,5-4,4 mm³ Gewebe pro Region. **D-K**, Exemplarische Aufnahmen sowie Dichtemessungen AT8-positiver Zellen in 12 Monate alten Tau-heterozygoten (**D-G**) bzw. 5-6 Monate alten Tau-homozygoten (**H-K**) Tau x CXCR-Mäusen mit modifizierter Fraktalkinrezeptor-Expression (Wt: Wildtyp, (+/-): Heterozygotie, (-/-): Knockout). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SA von 4-6 Mäusen; 4,1-4,8 mm³ Gewebe pro Kohorte. Maßstabsbalken: **A** 20 μ m; **A'** 10 μ m; **B** 1 mm, **D-F, H-J** 100 μ m.

3.3 Überprüfung der Amyloid-Kaskaden-Hypothese:

Tau- und A β -Pathologie im kombinierten Tau x APP PS1 Alzheimer-Mausmodell

Zum Erzeugen eines AD-Mausmodells und kritischen Überprüfen der Amyloid-Kaskaden-Hypothese (Kapitel 1.2.3) wurden die Mauslinien Tau P301S und APP PS1 verpaart (Linien-Kurzname Tau x APP PS1). (Die ebenfalls angestrebte Verpaarung der Tau-Mäuse mit der einfach *APP_{swe}*-transgenen Mauslinie Tg2576 (Hsiao et al., 1996) musste aufgrund der hohen pränatalen bzw. -maturalen Mortalität der Nachkommen abgebrochen werden.) Ein direkter immunhistologischer Pathologie-Vergleich des neuen kombinierten Mausmodells mit den beiden Ursprungslinien sollte Aufschluss über kausale Mechanismen sowie mögliche synergistische Effekte der exprimierten Transgene geben. Die gezüchteten Tiere waren zudem Träger des *YFP*-Transgens, sodass an ihnen auch intravitalmikroskopische Untersuchungen dendritischer Spines durchgeführt werden konnten.

3.3.1 Tau- und A β -Pathologie in Tau-, APP PS1- und Tau x APP PS1-Mäusen

Zunächst wurden AD-typische Läsionen in Gehirnpräparaten 9 Monate alter heterozygoter Tau-, APP PS1- und Tau x APP PS1-Mäuse verglichen. In Anlehnung an das Untersuchungsfeld des chronischen kraniellen Fensters wurden hierfür Frontalschnitte des visuellen Kortex histochemisch analysiert (**Abb. 25**).

Der Amyloid-bindende Farbstoff Methoxy-X04 markierte zahlreiche Plaques in APP PS1- und Tau x APP PS1-Mäusen (**Abb. 25B-C**), während in Tieren der Linie Tau P301S erwartungsgemäß kein Signal detektiert wurde. Diese zeigten hingegen vereinzelte Zellen mit AT8-immunoreaktivem Phospho-Tau (Detailaufnahme **Abb. 25D**), welche auch in Tau x APP PS1-Mäusen gefunden wurden (Detailaufnahme **Abb. 25F**). Trotz Ermangelung des *MAPT*-Transgens konnte in APP PS1-Mäusen ebenfalls AT8-immunoreaktives Tau-Protein detektiert werden (**Abb. 25E**). Dieses füllte jedoch niemals komplette Somata oder Neuriten; die meist rundlichen, gehäuft auftretenden Ablagerungen (Detailaufnahme **Abb. 25E**) umgaben vielmehr stets Methoxy-X04-positive amyloide Plaques und waren in dieser Form auch in der Mauslinie Tau x APP PS1 zu finden (Detailaufnahme **Abb. 25F**). (Eine quantitative Analyse dieser AT8-immunoreaktiven neuritischen Dystrophien folgt in Kapitel 3.3.2.) Die Tau-Pathologie in Tau x APP PS1-Mäusen ähnelte den somatodendritischen Tau-Aggregaten, Neuropilfäden und Dystrophien um neuritische Plaques im Gehirn von AD-Patienten (**Abb. 25G-H**). Somit zeigte dieses Mausmodell zahlreiche AD-charakteristische histologische Läsionen: A β -Ablagerungen in Form extrazellulärer Plaques und Amyloidangiopathie sowie intrazelluläre Aggregate hyperphosphorylierten Tau-Proteins.

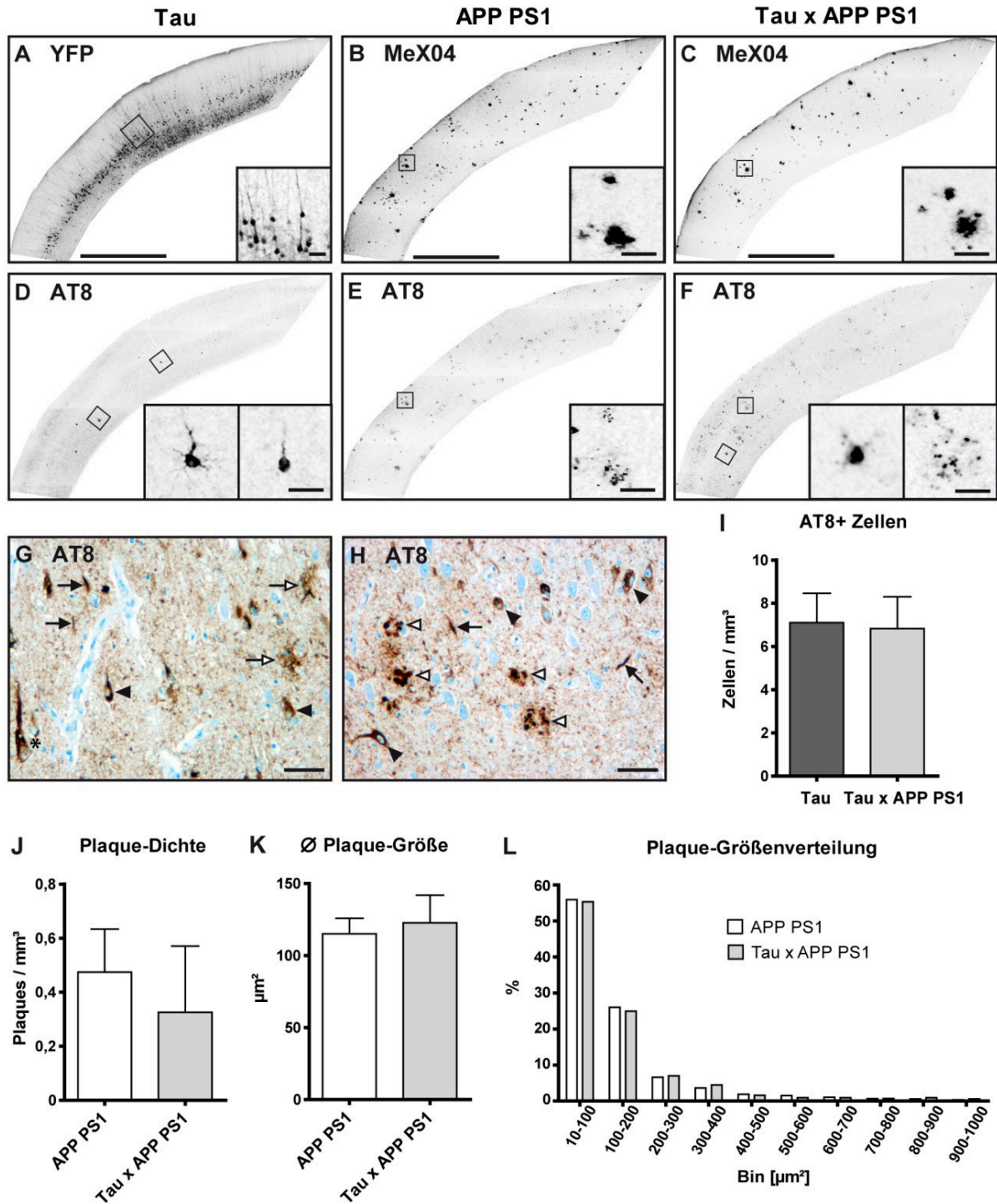
Gemäß der Amyloid-Kaskaden-Hypothese wäre eine Verstärkung der Tau-Pathologie in Tau x APP PS1-Mäusen im Vergleich zu Wurfgeschwistern ohne A β -Pathologie zu erwarten. Dichtemessungen Phospho-Tau-enthaltender Zellen (Antikörper AT8) wiesen jedoch keinen derartigen Effekt nach. In beiden Linien gleichermaßen fanden sich somatodendritische Tau-Ablagerungen nur in sehr wenigen kortikalen Zellen ($7,1 \pm 1,4$ Zellen/mm³ in Tau-Mäusen vs. $6,8 \pm 1,5$ Zellen/mm³ in Tau x APP PS1-Mäusen; **Abb. 25I**). Auch der motorische Phänotyp *MAPT*-transgener Mäuse (**Abb. 14F**), welcher auf das Absterben von Motoneuronen im Hirnstamm und Rückenmark zurückzuführen ist, war ähnlich ausgeprägt: Erste Beeinträchtigungen der Bewegungsmuster, insbesondere der Hinterläufe, wurden ab einem Alter von 11-12 Monaten offenkundig und führten letztlich zur Paraparese bei ca. 13 Monate alten Tieren.

Ein Vergleich der A β -Plaque-Pathologie in APP PS1- und Tau x APP PS1-Mäusen mittels Methoxy-X04-Färbungen offenbarte ebenfalls keine signifikanten Linien-Unterschiede. Dabei wurden sowohl die Plaque-Dichte (**Abb. 25J**), die mittlere Plaque-Größe (**Abb. 25K**), als auch die Plaque-Größenverteilung (**Abb. 25L**) in die Auswertung einbezogen. Die tendenziell – jedoch nicht signifikant – verminderte Plaque-Dichte in Tau x APP PS1-Mäusen ($0,33 \pm 0,25$ vs. $0,47 \pm 0,16$ Plaques/mm³ in APP PS1-Mäusen; **Abb. 25J**) ist möglicherweise auf den geringfügig unterschiedlichen genetischen Hintergrund der Linien zurückzuführen. Die Plaque-Dichten wiesen starke interindividuelle Schwankungen auf, wobei kein geschlechtsspezifischer Effekt in den untersuchten transgenen Linien gefunden wurde. Weitaus geringere Abweichungen wurden in der mittleren Plaque-Größe gemessen (APP PS1-Mäuse: $115,0 \pm 10,8$ μ m²; Tau x APP PS1-Mäuse: $122,8 \pm 19,1$ μ m²; **Abb. 25K**). Eine Auftrennung der einzelnen Plaques entsprechend ihrer Größe in 100 μ m²-Bins ergab, dass über 50 % der Plaques eine Fläche von 10-100 μ m² einnahmen und weniger als 20 % größer als 200 μ m² waren (**Abb. 25L**). Diese Größenverteilung war bei beiden Linien nahezu identisch.

Abb. 25 (S. 79): AD-typische Läsionen in Tau-, APP PS1- und Tau x APP PS1-Mäusen

A-F, Frontalschnitte des visuellen Kortex von 9 Monate alten Mäusen der Linien Tau x YFP (**A, D**), APP PS1 x YFP (**B, E**) und Tau x APP PS1 x YFP (**C, F**). Die Aufnahmen wurden zur Kontrastverstärkung invertiert. Zur Orientierung ist in **A** das YFP-Expressionsmuster zu sehen. Die Vergrößerung zeigt Somata und proximale Dendriten von Schicht V Neuronen. **B-C**, Visualisierung amyloider Plaques mit dem Fluorophor Methoxy-X04 (MeX04). **D-F**, Anfärbung von Phospho-Tau (Antikörper AT8) markiert einzelne Zellen in den *MAPT*-transgenen Tieren und neuritische Dystrophien um Plaques in APP PS1- und Tau x APP PS1-Mäusen (Detailaufnahmen). **G-H**, Anfärbung von Phospho-Tau (Antikörper AT8) in Gehirngewebe eines AD-Patienten. Einige Neuronen enthalten zytoplasmatisches Phospho-Tau (schwarze Pfeilköpfe); seltener sind NFT-ähnliche somatodendritische Färbungen zu finden (Asterisk). Außerdem sind Neuropilfäden (schwarze Pfeile) sowie Plaque-assoziierte Tau-Ablagerungen zu erkennen, die ein diffuses Erscheinungsbild haben

können (weiße Pfeile) oder mit klar definierten neuritischen Dystrophien korrespondieren (weiße Pfeilköpfe). **I**, Dichtemessungen AT8-immunoreaktiver Zellen in Tau- und Tau x APP PS1-Mäusen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SA von 4-5 Mäusen; 5,0 - 5,8 mm³ Gewebe pro Kohorte. **J-L**, Plaque-Dichten (**J**), mittlere Plaque-Größen (**K**) sowie die prozentuale Plaque-Größenverteilung in 100 μ m²-Bins (**L**) in APP PS1- und Tau x APP PS1-Mäusen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SA von je 5 Mäusen mit insgesamt 1832 - 2656 Plaques in 5,3 - 5,5 mm³ Gewebe pro Kohorte. Maßstabsbalken: **A-F** 1 mm; **G-H** und Details in **A-F** 50 μ m.



3.3.2 Neuritische Plaques in APP PS1- und Tau x APP PS1-Mäusen

Als nächstes sollte der Einfluss der *MAPT*-Transgenexpression auf Plaque-assoziierte, Phospho-Tau-immunoreaktive neuritische Dystrophien untersucht werden. Dazu wurden Plaque-Detailaufnahmen von APP PS1- und Tau x APP PS1-Mäusen (**Abb. 26A-C**) drei-dimensional (Volumina-Vergleich; **Abb. 26D-F**) sowie zwei-dimensional (Flächen-Vergleich; **Abb. 26G-L**) ausgewertet. Ein Vergleich der Volumen-Quotienten (AT8/Methoxy-X04) zeigte nahezu eine Verdoppelung des Wertes bei *MAPT*-transgenen Mäusen, ohne jedoch statistische Signifikanz zu erreichen (**Abb. 26D**). Diese Zunahme AT8-positiver neuritischer Dystrophien in Tau x APP PS1-Mäusen, insbesondere um größere Plaques, wurde auch widerspiegelt beim Auftragen der einzelnen Plaque- versus Dystrophien-Volumina (**Abb. 26E-F**). Dabei konnte jedoch ebenso wenig ein linearer Zusammenhang der beiden Parameter gefunden werden (Determinationskoeffizient $r^2 = 0,12$ bzw. $0,46$) wie bei einer zwei-dimensionalen Analyse derselben Datensätze ($r^2 = 0,23$ bzw. $0,27$; **Abb. 26G-H**). Betrachtete man Plaque- vs. Dystrophien-Flächen bei Mäusen mit unterschiedlichem Ausmaß der Tau-Pathologie, so war tendenziell eine positive Korrelation zwischen der Dystrophien-Fläche und dem Tau-Pathologie-Stadium festzustellen (**Abb. 26I-L**).

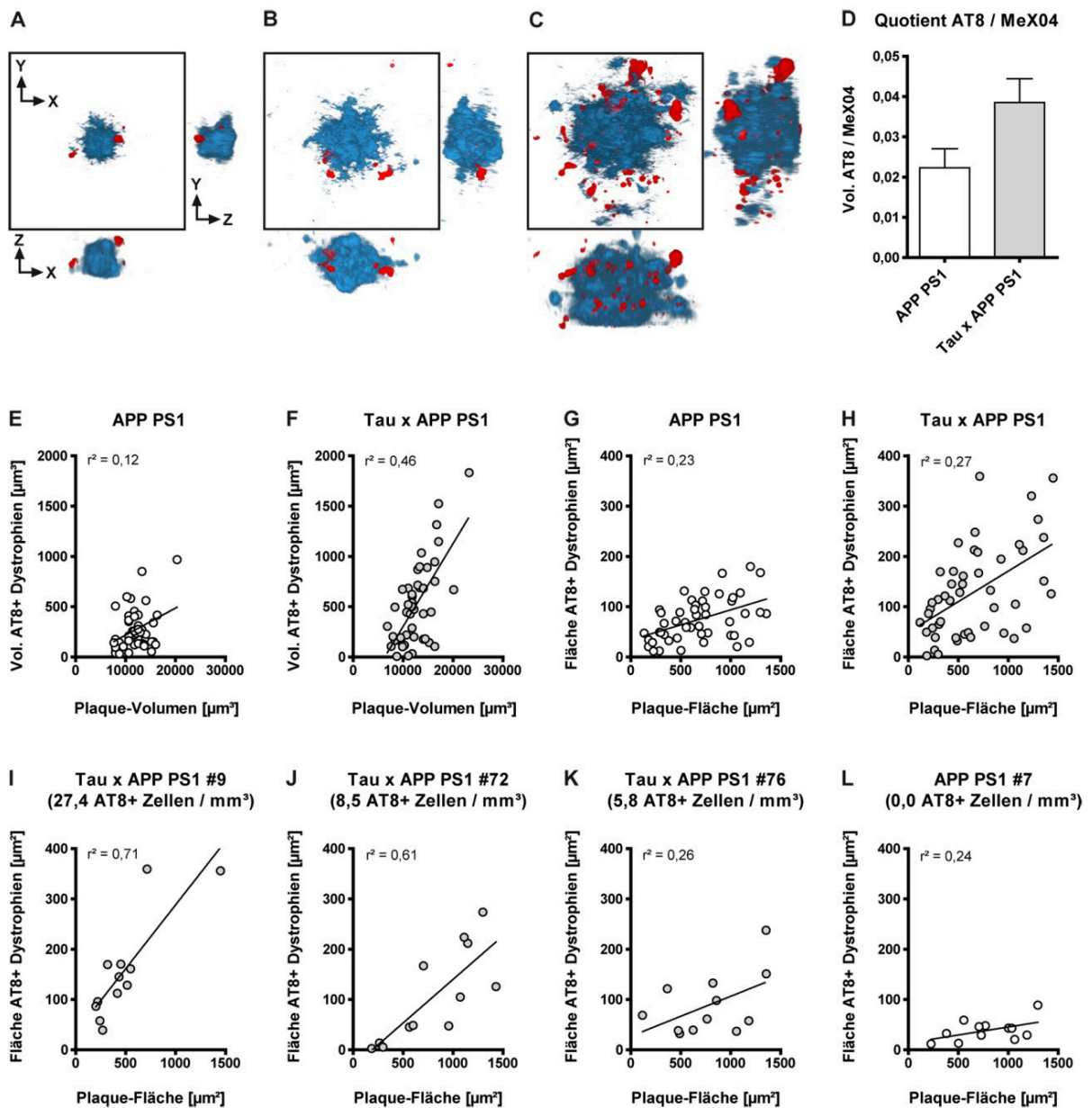


Abb. 26: Plaques und assoziierte Dystrophien in APP PS1- und Tau x APP PS1-Mäusen

A-C, Methoxy-X04 markierte amyloide Plaques (blau) und direkt assoziierte, Phospho-Tau enthaltende Dystrophien (Antikörper AT8, rot) im visuellen Kortex 9 Monate alter APP PS1- (**A-B**) und Tau x APP PS1-Mäuse (**C**). Zur räumlichen Veranschaulichung sind Maximumintensitätsprojektionen von 50 μm Z-Stapeln auf die X-, Y- und Z-Achsen dargestellt. Die Längen der Achsenpfeile entsprechen 10 μm . **D**, Volumen-Quotienten (AT8-immunoreaktive Dystrophien / Methoxy-X04-positive Plaques) von APP PS1- und Tau x APP PS1-Mäusen (Mittelwerte \pm SAM von 4 Mäusen pro Kohorte). **E-H**, Auftragung der einzelnen Plaque- vs. Dystrophien-Volumina (**E-F**) bzw. -Flächen (**G-H**) von APP PS1- und Tau x APP PS1-Mäusen (4 Mäuse pro Kohorte; 12 Plaques pro Maus). **I-L**, Getrennte Flächen-Auswertungen einzelner Tiere mit unterschiedlich starker Tau-Pathologie (gemessen an der Dichte kortikaler AT8-immunoreaktiver Zellen). r^2 : Determinationskoeffizient.

3.3.3 Spine-Dichten und -Kinetik in Tau-, Tau x APP PS1- und Wildtyp-Mäusen

Analog zur Analyse homozygoter Tau-Mäuse (Kapitel 3.1.2) wurden *YFP*-exprimierende kortikale dendritische Spines in Wildtyp-, Tau- und Tau x APP PS1-Mäusen im milden und weit fortgeschrittenen Krankheitsstadium intravitalmikroskopisch untersucht (**Abb. 27**):

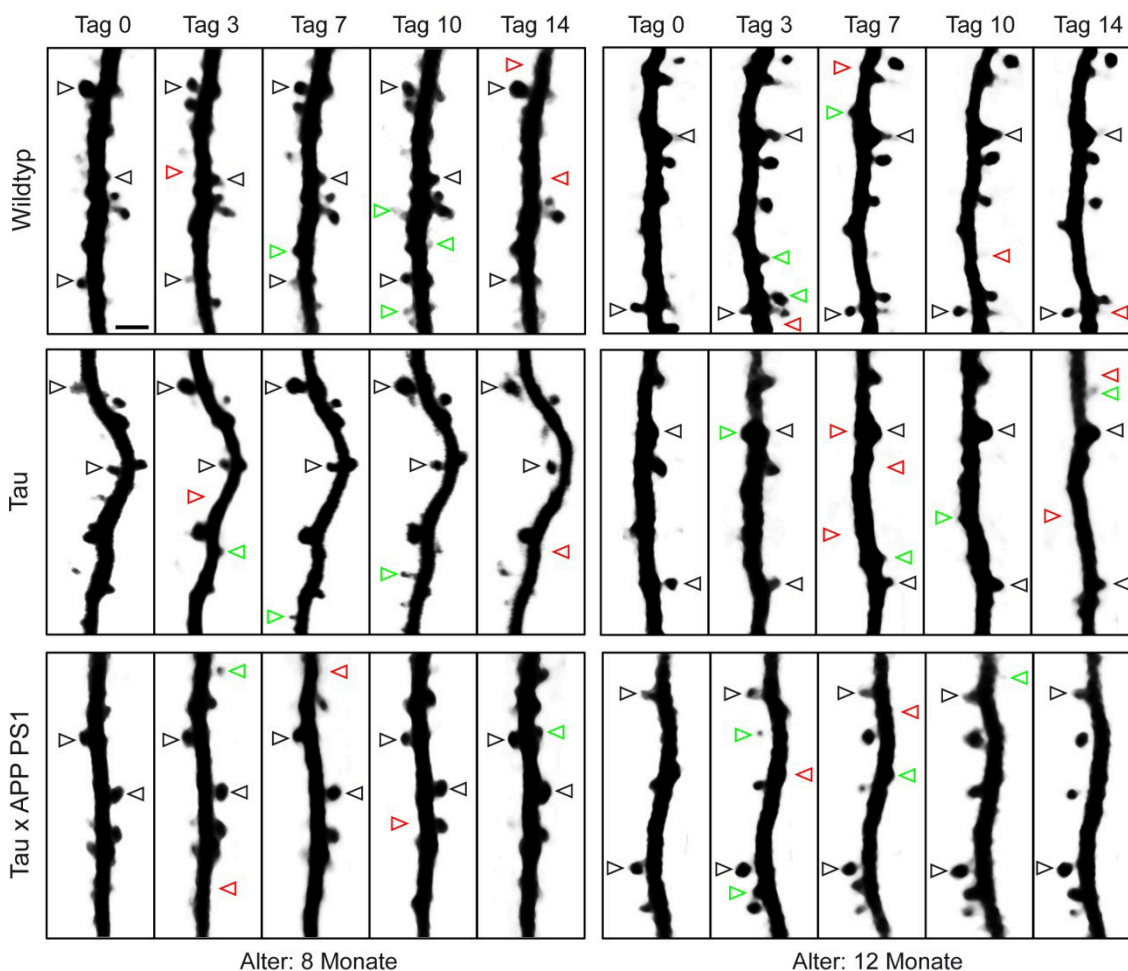


Abb. 27: Zeitserien dendritischer Spines in Wildtyp-, Tau- und Tau x APP PS1-Mäusen

Apikale Dendriten von *YFP*-exprimierenden Schicht V Neuronen wurden über einen Zeitraum von 2 Wochen alle 3-4 Tage aufgenommen. Dargestellt sind Maximumintensitätsprojektionen von Dendritenabschnitten 8 (linke Spalte) bzw. 12 (rechte Spalte) Monate alter Wildtyp- (obere Reihe), Tau- (mittlere Reihe) und Tau x APP PS1-Mäuse (untere Reihe). Die Pfeilköpfe markieren beispielhaft an aufeinanderfolgenden Aufnahme-Zeitpunkten stabile (schwarz), verlorene (rot) und neu entstandene dendritische Spines (grün). Maßstabsbalken: 2 μ m.

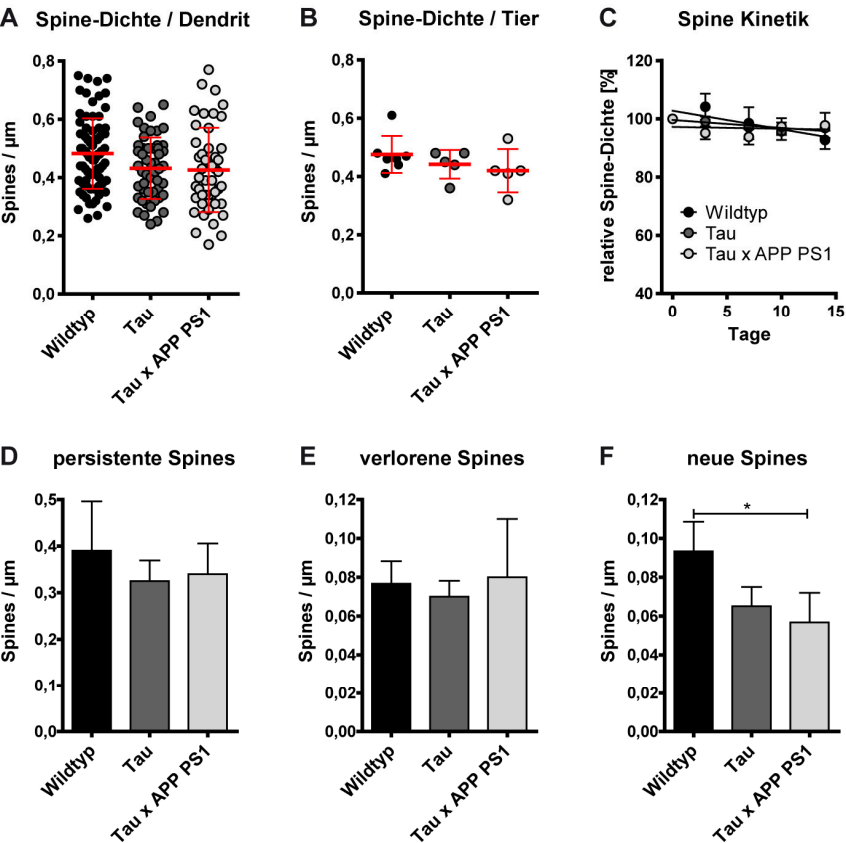
Ein Vergleich der Spine-Dichten am ersten Mikroskopie-Zeitpunkt zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mauslinien, was auch auf die hohe Streuung der Werte, insbesondere in den jüngeren Alterskohorten, zurückzuführen war (**Abb. 28A, G**). Es konnte jedoch eine leichte altersabhängige Reduktion der mittleren Spine-Dichten gemessen

werden (0,38-0,43 Spines/ μm^2 in einjährigen Tieren vs. 0,42-0,48 Spines/ μm^2 in 8 Monate alten Tieren; **Abb. 28B, H**). Im Verlauf der zweiwöchigen Mikroskopieserie veränderten sich die relativen Spine-Dichten nur geringfügig (**Abb. 28C, I**); lediglich in 12 Monate alten Tau-Mäusen nahm die Dichte graduell ab und fiel auf $89,8 \pm 0,5$ % des Ausgangswerts.

Die Analyse individueller Spines an aufeinanderfolgenden Mikroskopie-Zeitpunkten zeigte einen tendenziellen Rückgang persistenter, also mindestens 7 Tage stabiler Spines in alten Tau x APP PS1-Mäusen, der jedoch keine statistische Signifikanz erreichte (**Abb. 28D, J**). Die Dichten neuer und verlorener Spines (**Abb. 28E-F, K-L**) waren bei Wildtyp-Mäusen ausgeglichen, wobei eine altersabhängige Gesamtabnahme der Umsatzrate ermittelt wurde. Diese Balance war bei einjährigen Tau-Mäusen gestört: Die Bildung neuer Spines nahm entsprechend den Wildtyp-Mäusen altersabhängig ab (**Abb. 28L**), was bei einer nahezu unveränderten Dichte verlorener Spines (**Abb. 28K**) die Netto-Abnahme der relativen Spine-Dichte in einjährigen Tieren erklärt (**Abb. 28I**). In 8 Monate alten Tau x APP PS1-Mäusen wurden weniger neue Spines als in Wildtyp-Mäusen gebildet (**Abb. 28F**). Dieser Trend kehrte sich jedoch in einjährigen Tieren um, da die Spine-Umsatzrate – d. h. die Dichten neuer sowie verlorener Spines – in Tau x APP PS1-Mäusen unvermindert hoch war (**Abb. 28K-L**).

Ähnliche Studien an anderen AD-Mausmodellen suggerieren eine Korrelation zwischen Plaque-Abstand und dendritischer Spine-Dichte (Spires et al., 2005; Spires-Jones et al., 2007). Daher sollte dieser Zusammenhang auch im Tau x APP PS1-Mausmodell untersucht werden (**Abb. 29**). Bei einer Auswahl von 56 Dendritenabschnitten in 6 Mäusen konnte jedoch kein signifikanter derartiger Effekt gemessen werden: Auch bei einem Plaque-Abstand von $< 50 \mu\text{m}$ waren die Spine-Dichten unvermindert (**Abb. 29B-C**).

Alter: 8 Monate



Alter: 12 Monate

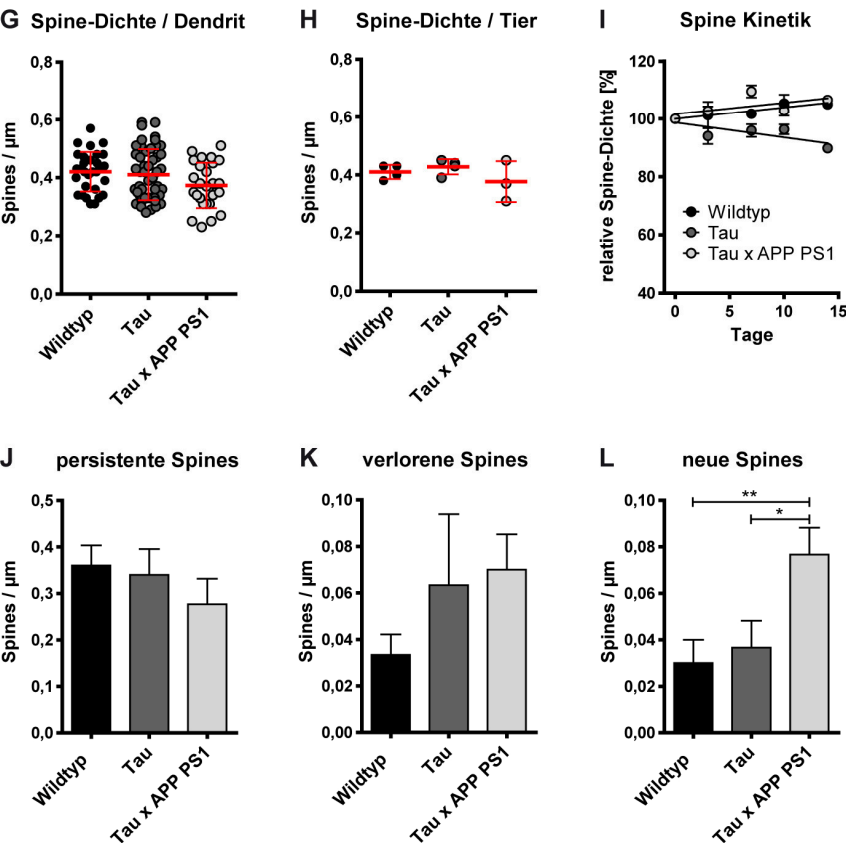
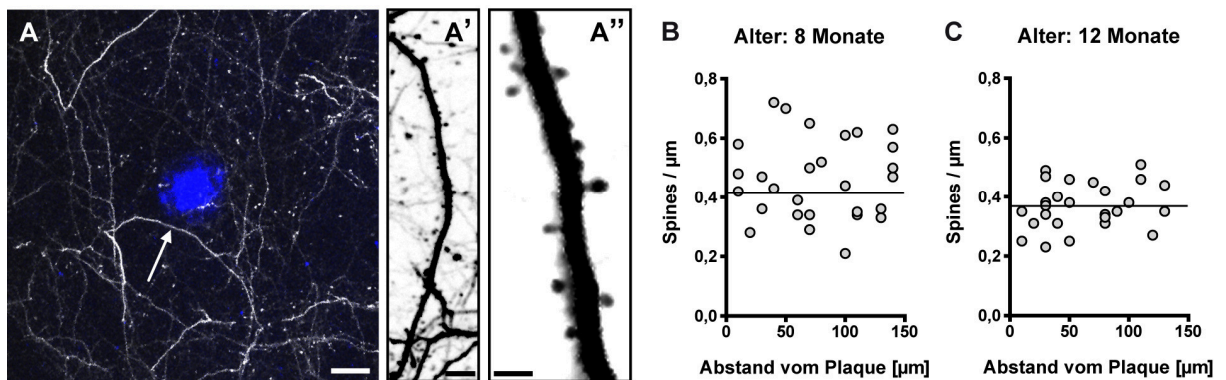


Abb. 28 (S. 84): Spine-Dichten und -Kinetik in Wildtyp-, Tau- und Tau x APP PS1-Mäusen

Quantifizierung der intravitalmikroskopischen Spine-Daten von 8 (**A-F**) und 12 (**G-L**) Monate alten Wildtyp-, Tau- und Tau x APP PS1-Mäusen. Spine-Dichten pro Dendrit (**A, G**) bzw. pro Maus (**B, H**) am ersten Aufnahme-Zeitpunkt (8 Monate: 46-79 Dendriten in 5-7 Mäusen pro Gruppe; 12 Monate: 27-50 Dendriten in 3-4 Mäusen pro Gruppe; Mittelwerte \pm SA in rot). **C** und **I**, Relative Spine-Dichten im Verlauf des zweiwöchigen Untersuchungszeitraums, bezogen auf den am ersten Aufnahme-Zeitpunkt ermittelten Messwert (Mittelwerte \pm SA in rot von 35-42 (**C**) bzw. 18-26 (**I**) Dendriten in 3-4 Mäusen pro Kohorte; lineare Approximation; F-Test der Mittelwerte: $P < 0,05$). **D-F** und **J-L**, Dichten persistenter (**D, J**), verlorener (**E, K**) und neuer Spines (**F, L**) (Mittelwerte \pm SA von 3-4 Mäusen pro Kohorte; 35-42 (**D-F**) bzw. 18-26 (**J-L**) Dendriten; ANOVA mit Bonferroni-Test: * $P < 0,05$; ** $P < 0,005$).

**Abb. 29: Spine-Dichten und Plaque-Entfernung in Tau x APP PS1-Mäusen**

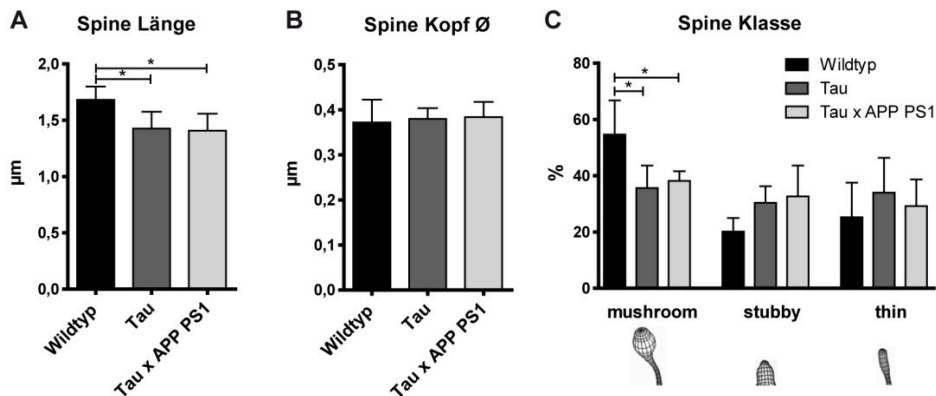
A, Intravitalmikroskopische Aufnahme eines amyloiden Plaques (angefärbt mit Methoxy-X04, blau) inmitten von Neuriten YFP-exprimierender Neurone (weiß) im Kortex einer 8 Monate alten Tau x APP PS1-Maus. Die Abbildung zeigt die Maximumintensitätsprojektion eines 30 μm Z-Stapels. **A'-A''**, Vergrößerungen des in **A** mit einem Pfeil markierten Dendritenabschnitts. Maßstabsbalken: **A** 20 μm ; **A'** 5 μm ; **A''** 2 μm . **B** und **C**, Auftragung der Spine-Dichten in Relation zum Abstand des Dendritenabschnitts zum nächsten Plaque-Rand in 8 (**B**, 29 Dendriten in 3 Mäusen) und 12 (**C**, 27 Dendriten in 3 Mäusen) Monate alten Tieren. Horizontale Linien: Mittelwerte pro Alterskohorte.

3.3.4 Spine-Morphologie in Tau-, Tau x APP PS1- und Wildtyp-Mäusen

Einzelne Spines wurden semiautomatisch nachmodelliert und morphologische Parameter gemessen (**Abb. 30**). Sowohl Tau- als auch Tau x APP PS1-Mäuse zeigten im Alter von 8 Monaten eine verminderte Spine-Länge (Wildtyp: $1,68 \pm 0,12 \mu\text{m}$; Tau: $1,43 \pm 0,15 \mu\text{m}$; Tau x APP PS1: $1,41 \pm 0,15 \mu\text{m}$), jedoch nicht in den älteren Kohorten; **Abb. 30A, D**). Der mittlere Spine-Kopfdurchmesser war in allen Linien nahezu identisch (0,36-0,38 μm) und lediglich in alten Tau x APP PS1-Mäusen tendenziell, jedoch nicht signifikant verringert ($0,33 \pm 0,01 \mu\text{m}$; **Abb. 30B, E**). Eine Klassifizierung in mushroom, stubby und thin Spines offenbarte eine Abnahme der mushroom-Fraktion in jungen Tau- und Tau x APP PS1-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (Wildtyp: $54,7 \pm 12,1 \%$; Tau $35,6 \pm 8,0 \%$; Tau x

APP PS1: $38,2 \pm 3,4 \%$; **Abb. 30C**). Diese war auch in einjährigen Tau x APP PS1-Mäusen zu messen (Wildtyp: $64,0 \pm 4,3 \%$; Tau: $50,6 \pm 12,9 \%$; Tau x APP PS1: $37,1 \pm 2,5 \%$; **Abb. 30F**). Gleichzeitig war der Anteil von stubby und thin Spines in Tau- und Tau x APP PS1-Mäusen tendenziell erhöht, ohne jedoch statistische Signifikanz zu erreichen.

Alter: 8 Monate



Alter: 12 Monate

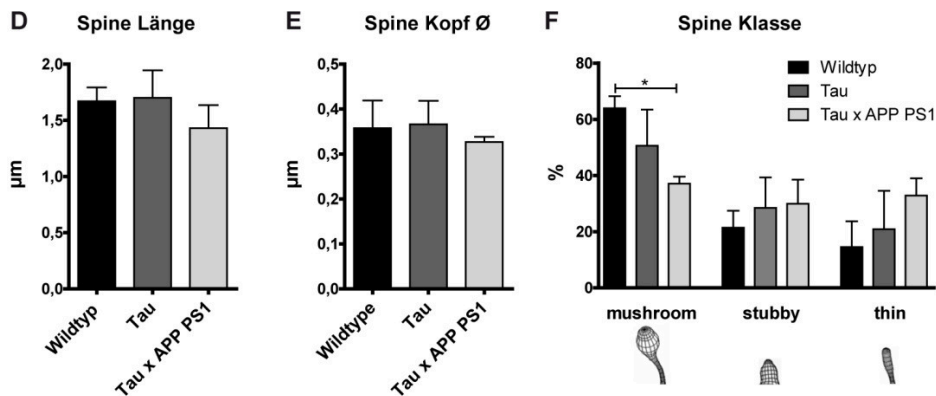


Abb. 30: Spine-Morphologie in Wildtyp-, Tau- und Tau x APP PS1-Mäusen

Quantifizierung morphologischer Spine-Parameter in 8 (**A-C**) und 12 (**D-F**) Monate alten Wildtyp-, Tau- und Tau x APP PS1-Mäusen: durchschnittliche Spine-Längen (**A, D**) und -Kopfdurchmesser (**B, E**), sowie die darauf basierende prozentuale Verteilung der Spine-Klassen mushroom, stubby und thin (**C, F**). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SA von **A-C**: 5 Mäusen pro Kohorte (18-20 Dendriten, 256-295 Spines), **D-F**: 3-5 Mäusen pro Kohorte (14-17 Dendriten, 162-198 Spines); ANOVA mit Bonferroni - Test: * $P < 0,05$.

3.4 Elektronenmikroskopische Untersuchung der ultrastrukturellen Pathologie im 3xTg-AD Alzheimer-Mausmodell

Pathologische Veränderungen der Neuromorphologie wie beispielsweise neuritische Dystrophien in unmittelbarer Nähe amyloider Plaques sind typisch für das Gehirngewebe von AD-Patienten (Masliah et al., 1993; **Abb. 25G-H**). Ähnliche Läsionen lassen sich in den hier untersuchten Mausmodellen nachweisen: Intravitalmikroskopische Analysen YFP-exprimierender Neuronen in Tau- und Tau x APP PS1-Mäusen zeigten vereinzelte neuritische Anschwellungen. Diese konnten während des Untersuchungszeitraums weiter anwachsen oder jedoch schrumpfen. Manchmal waren YFP-negative Einschlüsse in großen Dystrophien zu erkennen. Es wurde kein Absterben der betroffenen Zellen beobachtet. Auch alte Mäuse der Linie 3xTg-AD x YFP entwickeln Plaque-unabhängige dystrophe Dendriten, welche den Verlust kortikaler dendritischer Spines verursachen (Bittner et al., 2010). Im Folgenden sollte die zugrundeliegende ultrastrukturelle Pathologie im Kortex und Hippocampus der Tiere mittels TEM immunhistochemisch analysiert werden.

3.4.1 Hippocampale A β - und Tau-Pathologie

3xTg-AD x YFP-Mäuse weisen altersabhängige A β - und Tau-Pathologie in verschiedenen Gehirnregionen wie dem Hippocampus und Kortex auf. Im Kontrast zu einer relativ geringen kortikalen Dichte konnten im Hippocampus 24 Monate alter Mäuse zahlreiche amyloide Plaques gefunden werden. Die sie umgebenden Neuriten YFP-exprimierender Zellen zeigten degenerative Veränderungen. Die kugelförmigen Anschwellungen waren meistens voneinander separiert, ohne sichtbare Verbindungen. Manchmal wiesen herausragende Spines auf einen dendritischen Ursprung hin. Auf TEM-Aufnahmen waren häufig Ansammlungen elektronendichter zellulärer Verfallsprodukte in den neuritischen Dystrophien zu erkennen (**Abb. 31A**).

Die Somata und Dendriten vieler hippocampaler CA1-Neuronen waren dicht gefüllt mit Phospho-Tau (**Abb. 31B-D**). Somit erfolgte hier eine für Tauopathien charakteristische Umverteilung des Tau-Proteins von der physiologischen Mikrotubuli-assoziierten axonalen Lokalisierung ins somatodendritische Zellkompartiment. Auch bei AD-Patienten liegen in der CA1-Region bereits in einer frühen Krankheitsphase (Braak-Stadium II) Tau-Ablagerungen in Form von NFTs und Neurofibrillen vor (Braak und Braak, 1991). Im Mausmodell fanden sich außerdem oftmals Ablagerungen von Phospho-Tau an Mitochondrien, vorzugsweise an deren äußerer Membran (**Abb. 31E-I**).

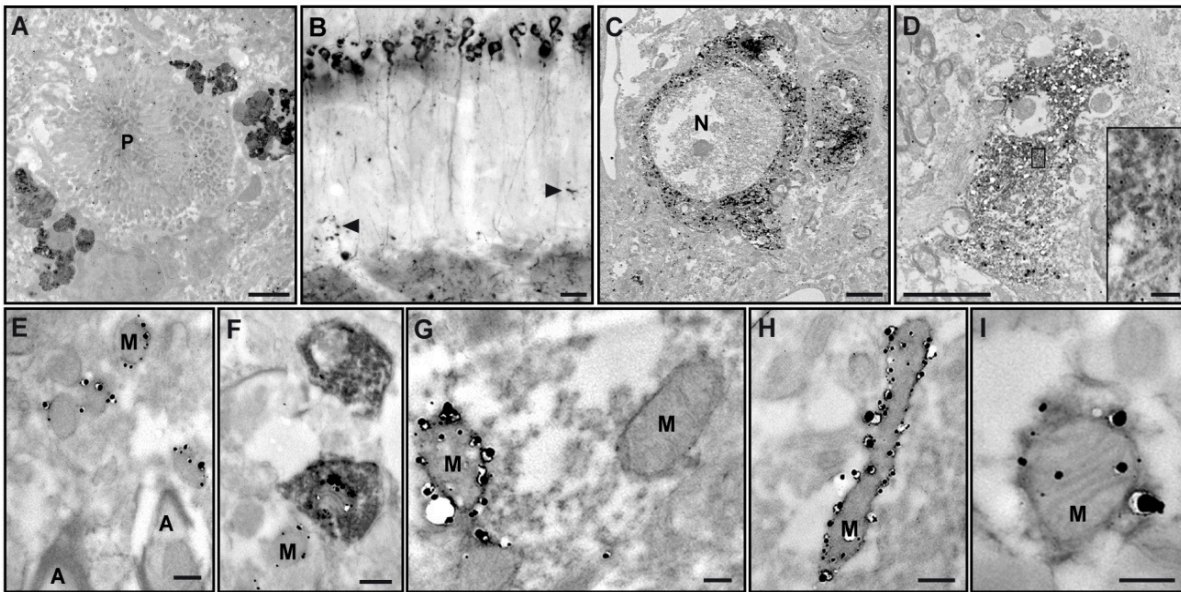


Abb. 31: A β - und Tau-Pathologie im Hippocampus alter 3xTg-AD x YFP-Mäuse

TEM- (A, C-I) und lichtmikroskopische (B) Aufnahmen AD-typischer Läsionen im Hippocampus einer 2 Jahre alten 3xTg-AD x YFP-Maus. A, Amyloider Plaque (P) mit angrenzenden YFP-positiven neuritischen Dystrophien (Antikörper GFP, DAB-Färbung), gefüllt mit elektronendichten zellulären Verfallsprodukten. B, Phospho-Tau (Antikörper AT8, DAB-Färbung) in den Somata und Dendriten von CA1-Neuronen sowie in Plaque-assoziierten neuritischen Dystrophien (Pfeilköpfe). C-I, Phospho-Tau (Antikörper AT8, Silber-verstärkte Immunogold-Färbung) im gesamten Zytoplasma eines CA1-Neurons (C; N: Nucleus), in einem Dendriten-Abschnitt (D), sowie an der äußeren Membran von Mitochondrien (E-I). F, Phospho-Tau positive Mitochondrien neben und in Neuriten YFP-exprimierender Neuronen (Antikörper GFP, DAB-Färbung). A: Axon; M: Mitochondrium. Maßstabsbalken: B 20 µm; A, C, D 2 µm; Vergrößerung in D 100 nm; E-I 200 nm.

3.4.2 Kortikale neuritische Dystrophien enthalten Phospho-Tau und A β

Einige YFP-exprimierende kortikale Neuronen in 3xTg-AD x YFP-Mäusen entwickelten Plaque-unabhängige neuritische Dystrophien (**Abb. 32A-D**). Diese waren meistens in den oberflächlichen Schichten I-II zu finden und teilweise apikalen Dendriten von Schicht II/III oder V Neuronen zuzuordnen (**Abb. 32B-C**). Andere waren axonalen Ursprungs (**Abb. 32D'**). Manche Dystrophien zeigten eine Perlenketten-förmige Anordnung und konnten die Größe von Zellkörpern erreichen. An einigen dendritischen Dystrophien waren Spine-förmige Ausstülpungen zu erkennen (**Abb. 32B-C**). Anders als im Hippocampus enthielten viele der großen Anschwellungen YFP-negative Vakuolen, zu deren genauerer Untersuchung elektronenmikroskopische Aufnahmen erzeugt wurden (**Abb. 32E-G**). Dabei konnten in allen derartigen Dystrophien heterogene, oftmals fibrilläre Ansammlungen von Phospho-Tau (**Abb. 32E-F**) sowie A β (**Abb. 32G**) nachgewiesen werden, teilweise jedoch auch augenscheinlich leere Vakuolen.

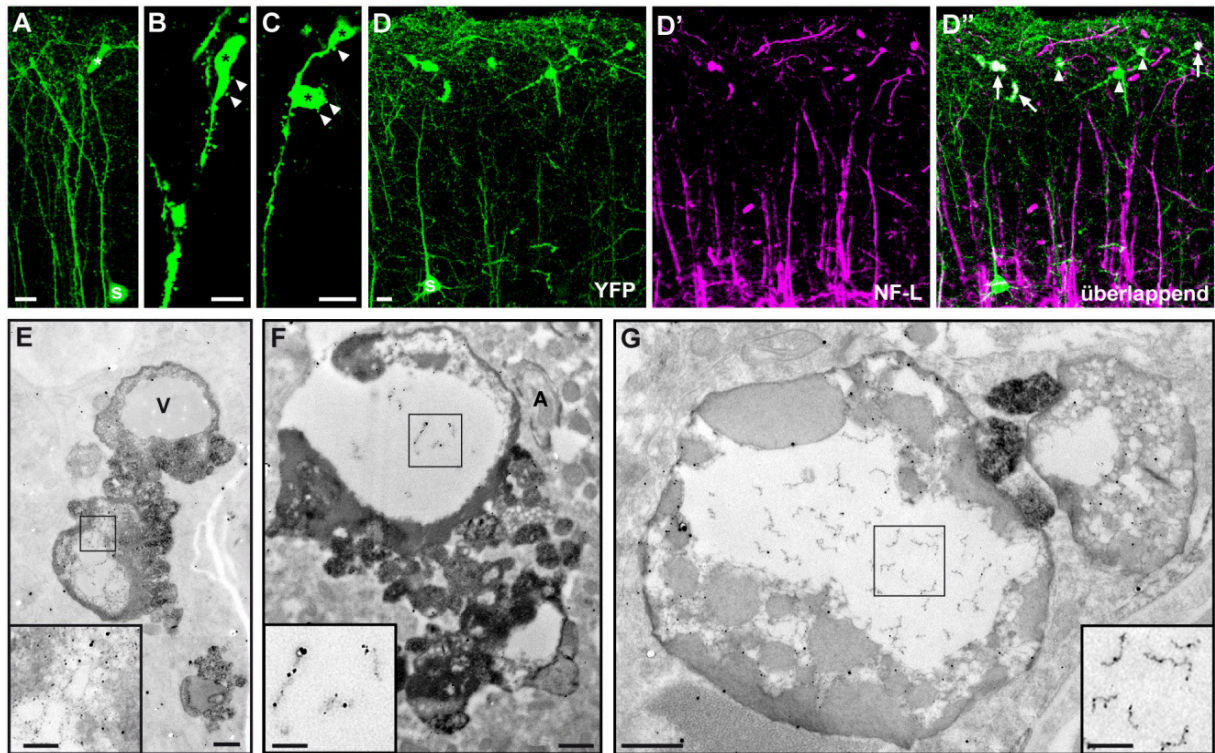


Abb. 32: Neuritische Dystrophien im Kortex alter 3xTg-AD x YFP-Mäuse

A-D, Konfokale LSM-Aufnahmen YFP-exprimierender Neuronen im visuellen Kortex einer 2 Jahre alten 3xTg-AD x YFP-Maus (Maximumintensitätsprojektionen von 5 bzw. 10 μm Z-Stapeln; S: Soma). Asteriske in **A-C** markieren Plaque-unabhängige neuritische Dystrophien, Pfeilköpfe in **B** und **C** Spines an dendritischen Anschwellungen. **D'-D''**, Immunhistochemische Anfärbung der Axone großer projizierender Neuronen (Antikörper NF-L gegen die leichte Neurofilament-Untereinheit; magenta) zeigt, dass einige Dystrophien axonalen Ursprungs sind (Pfeile), andere hingegen dendritisch (Pfeilköpfe). **E-G**, Querschnitte durch neuritische Dystrophien. Die TEM-Aufnahmen zeigen Doppelfärbungen von YFP-exprimierenden Neuronen (Antikörper GFP, DAB-Färbung) und Phospho-Tau (**E-F**, Antikörper AT8) bzw. A β (**G**, Antikörper 6E10, je Silber-verstärkte Immunogold-Färbung; A: Axon, V: Vakuole). Maßstabsbalken: **A-D** 10 μm ; **E-G** 500 nm; Vergrößerungen in **E-G** 200 nm.

4. DISKUSSION

4.1 Synaptische Pathologie in Tauopathien

Grundlegende Untersuchungen zur Rolle des Tau-Proteins in neurodegenerativen Erkrankungen wurden in den vergangenen Jahren vereinfacht durch die Erzeugung dutzender *MAPT*-transgener Mausmodelle (Brandt et al., 2005; Götz und Ittner, 2008; Morris et al., 2011; Spire-Jones et al., 2009). Dabei wurden jedoch – je nach analysierter Mauslinie, Krankheitsstadium und Gehirnbereich – inkonsistente Effekte des Tau-Proteins auf synaptische Spezialisierungen gefunden, wie in den folgenden Abschnitten näher erläutert werden soll. Da bisherige Studien zur synaptischen Pathologie in Tauopathie-Mausmodellen zumeist an Gehirnschnitten oder neuronalen Zellkulturen durchgeführt wurden, zeigen sie keine intravitale kinetischen Daten, welche nur durch Langzeituntersuchungen am lebenden Organismus erhoben werden können.

4.1.1 Veränderungen dendritischer Spines in Tauopathie-Mausmodellen

In der vorliegenden Studie wurde mittels Zwei-Photonen-Intravitalmikroskopie im Kortex 4 Monate alter homozygoter Tau P301S-Mäuse eine gegenüber gleichaltrigen Wildtyp-Mäusen reduzierte und kontinuierlich weiter abnehmende Spine-Dichte an apikalen Dendriten YFP-exprimierender Schicht V Pyramidenneuronen gemessen. Im Rahmen Erfahrungs-abhängiger synaptischer Plastizitätsmechanismen wird selbst im adulten Gehirn ständig ein geringer Anteil dendritischer Spines neu formiert oder abgebaut (Trachtenberg et al., 2002). Zugrundeliegende Veränderungen im Aktinfilament-Gerüst, welche die Spine-Morphologie modifizieren, können sich in Zeiträumen von Sekunden bis Stunden ereignen (Testa et al., 2012). Daher kann eine Abnahme der Spine-Gesamtzahl entweder auf dem Verlust persistenter Spines, einer verringerten Ausbildung neuer Spines oder einem erhöhten Anteil verlorener Spines beruhen. Durch detaillierte Auswertung kinetischer Daten auf Ebene einzelner Spines ließ sich der Spine-Verlust in homozygoten Tau P301S-Mäusen auf eine verminderte Dichte neu entstehender Spines zurückführen. Die Dichten stabiler (bzw. persistenter) und verlorener Spines hingegen waren größtenteils unverändert. Die verbliebenen Spines unterliefen eine morphologische Reorganisation: Sie waren länger und ihr Kopfvolumen war stark vergrößert. Dies erklärt den Anstieg der mushroom Spine-Fraktion auf Kosten der thin Spines.

Andere Untersuchungen zur synaptischen Pathologie in Tauopathie-Mausmodellen resultierten in teilweise widersprüchlichen Ergebnissen, dendritische Spines betreffend:

rTg4510-Mäuse, transgene Träger von humanem *MAPT* mit der FTDP-17 Mutation P301L, zeigen eine reduzierte Spine-Dichte und Dendritenbaumausbildung von kortikalen Pyramidenneuronen – unabhängig davon, ob diese NFTs enthalten oder nicht (Kopeikina et al., 2013; Rocher et al., 2010). Synapsenverlust im Hippocampus vor der Entstehung fibrillärer Tangles wurde auch für eine Mauslinie beschrieben, welche humanes P301S Tau-Protein unter dem murinen *Prion*-Promotor exprimiert (Yoshiyama et al., 2007). Im Gegensatz dazu wurde in Mäusen, welche humanes P301L oder Wildtyp Tau-Protein exprimieren, ein altersabhängiger Anstieg der Spine-Dichte in kortikalen Schicht III Neuronen gefunden, jedoch kein Effekt im Hippocampus (Kremer et al., 2011). In kortikalen Schicht III Neuronen von Mäusen, welche statt murinem Tau-Protein alle sechs humanen Tau-Isoformen exprimieren, nimmt das Spine-Volumen mit fortschreitendem Alter ab, während die Spine-Dichte unbeeinflusst ist (Dickstein et al., 2010). In Anbetracht dieser inkonsistenten Befunde fällt es schwer, eine generelle Schlussfolgerung darüber abzuleiten, in welcher Form die (Über-)Expression von (mutiertem) Tau-Protein die strukturelle Plastizität dendritischer Spines beeinträchtigt. Ein direkter Vergleich der Ergebnisse wird sowohl durch genetische Unterschiede der Mausmodelle als auch durch spezifische Eigenschaften der analysierten Neuronenpopulationen erschwert.

Das Spine-Kopfvolumen steht in proportionalem Zusammenhang mit der Größe der postsynaptischen Dichte und dem AMPA-Rezeptor Gehalt (Holtmaat und Svoboda, 2009). Die ermittelte Spine-Umformung in Tau P301S-Mäusen, insbesondere durch Volumenzunahme, könnte daher einen protektiven Mechanismus zur Kompensation des Nettospineverlusts darstellen: Eine höhere Anzahl von AMPA-Rezeptoren in den vergrößerten Spine-Köpfen stärkt die verbliebenen synaptischen Kontakte. Für eine derartige Ausgleichsreaktion spricht auch der prozentuale Anstieg der mushroom Spines, welche zumeist stabil sind (Holtmaat et al., 2005). Überdies wird die Dichteabnahme der neuentstehenden Spines morphologisch in der verringerten Fraktion der thin Spines widerspiegelt, da diese als transiente Vorstufen der größeren etablierten Spines gelten (Arellano et al., 2007; Holtmaat et al., 2005). Auch bei AD-Patienten wurde eine negative Korrelation zwischen der Synapsendichte und der Kontaktfläche verbliebener Synapsen gefunden, was auf ähnliche kompensatorische Plastizitätsmechanismen hinweist (Scheff und Price, 2003).

Aufgrund methodischer Einschränkungen war es nicht möglich, das Schicksal einzelner dendritischer Spines und ihrer präsynaptischen Pendants (z. B. axonaler Boutons) intravitalmikroskopisch synchron zu verfolgen. Es ist somit nicht auszuschließen, dass die beschriebenen postsynaptischen Veränderungen durch eine axonale Pathologie hervorgerufen wurden, welche in Tauopathien sehr stark ausgeprägt sein kann (Higuchi et al., 2002; Leroy et al., 2007; Spittaels et al., 1999). Bei Retina-Untersuchungen des hier

verwendeten Tauopathie-Mausmodells wurden starke Axonopathie und Ablagerungen hyperphosphorylierten Tau-Proteins im Sehnerv gefunden, noch bevor fibrilläres Tau in Ganglienzellen nachgewiesen werden konnte (Gasparini et al., 2011). Außerdem zeigen homozygote Tau P301S-Mäuse ab einem Alter von 3 Monaten in den kortikalen Schichten I/II starke Neurodegeneration, begleitet von Astroglieose, wobei jedoch besonders GABAerge Interneuronen betroffen sind (Hampton et al., 2010). Folglich kann alleine basierend auf den kinetischen Spine-Daten keine verlässliche Aussage darüber getroffen werden, ob der gemessene Verlust postsynaptischer Spezialisierungen in Tau-Mäusen ein primäres oder sekundäres Ereignis darstellt, ausgelöst durch axonale Pathologie präsynaptischer Neuronen bzw. durch Beeinträchtigungen des gesamten lokalen Netzwerks.

4.1.2 Gehirnregions-spezifische Fehlverteilung von Phospho-Tau in Spines

Mehrere Studien suggerieren, dass die Tau-Lokalisierung in dendritischen Spines synaptische Dysfunktion in hippocampalen Neuronen von FTDP-17- und AD-Mausmodellen vermittelt (Hoover et al., 2010; Ittner et al., 2010). Prä- und postsynaptische Ablagerungen von Tau-Filamenten wurden auch im Hippocampus anderer *MAPT*-transgener Mäuse elektronenmikroskopisch nachgewiesen (Takahashi et al., 2010; Yoshiyama et al., 2007).

Die hier durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen an Gehirnschnitten homozygoter Tau P301S-Mäuse zeigten Phospho-Tau-Ablagerungen in Spine-ähnlichen dendritischen Ausstülpungen hippocampaler CA3-Neuronen. In dendritischen Spines der kortikalen Pyramidenneuronen, welche für die Intravitalmikroskopie zugänglich sind, konnte hingegen kein Tau-Protein detektiert werden – selbst in solchen Neuronen, deren somatodendritisches Kompartiment fast vollständig mit Phospho-Tau-Filamenten gefüllt war. Dieser Negativ-Befund wurde durch die Verwendung unterschiedlicher Tau-Antikörper (HT7, AT8, AT100, AT180) sowie mehrerer Gewebefixierungsmethoden (PFA und Bouin-Lösung) abgesichert. Anstelle methodischer Restriktionen sollten also Gehirnregions-spezifische Mechanismen erklärend in Betracht gezogen werden.

Auch für andere Tauopathie-Mausmodelle wurden Unterschiede in der subzellulären Lokalisierung des Tau-Proteins in hippocampalen und kortikalen Neuronen beschrieben (Kremer et al., 2011). Zudem unterstützen ähnliche Befunde im Gehirngewebe von AD-Patienten die Regionen-spezifische Fehllokalisierung von Phospho-Tau in dendritischen Spines: Dort wurde in den dornigen Ausstülpungen hippocampaler CA3-Neuronen hyperphosphoryliertes Tau-Protein nachgewiesen, nicht jedoch in dendritischen Spines weiterer Regionen der Hippocampusformation oder des angrenzenden Kortex (Blazquez-Llorca et al., 2011; Merino-Serrais et al., 2013). Andererseits zeigte eine Studie an

Synaptosomenpräparaten von AD-Patienten, dass Phospho-Tau auch im Neokortex synaptisch akkumuliert – wenngleich in schwächerem Ausmaß als im Hippocampus und entorhinalen Kortex (Fein et al., 2008). Während das Zytoskelett in Spines kortikaler Pyramidenneuronen primär auf Aktin-Filamenten basiert, enthalten manche langen CA3-Spines Mikrotubuli (Chicurel und Harris, 1992; Sorra und Harris, 2000). Dies erklärt das Vorkommen von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen wie Tau in den Ausstülpungen. Zudem könnten derartige postsynaptische Ansammlungen von Phospho-Tau auch Fehlfunktionen in lokalen oder weiter entfernten Nervennetzwerken verursachen und somit indirekt auch kortikale Neuronen beeinträchtigen.

4.1.3 Auf der Suche nach der toxischen Tau-Spezies

Die Gesamtabnahme und gleichzeitige Umformung dendritischer Spines in Tau P301S-Mäusen fand in Abwesenheit intrazellulären hyperphosphorylierten Tau-Proteins in den analysierten kortikalen Neuronen statt. Eine derartige Entkopplung von synaptischer Pathologie und Phospho-Tau steht in Einklang mit weiteren Studien, welche umgekehrt demonstrieren, dass Tau-Aggregate und selbst NFTs nicht ausreichend sind, um kognitive Beeinträchtigungen oder Neurodegeneration hervorzurufen:

In einem reversiblen Tauopathie-Mausmodell bewirkt die Suppression des *MAPT*-Transgens eine Erholung der zuvor verminderten Gedächtnisleistung trotz fortschreitender NFT-Ablagerung (SantaCruz et al., 2005). Auch die in derselben Mauslinie sowie in humanen AD-Gehirnen gefundene Fehlverteilung von Mitochondrien wird durch lösliches, nicht-aggregiertes Tau-Protein verursacht (Kopeikina et al., 2011). Zudem sind strukturelle und funktionelle neuronale Veränderungen in unterschiedlichen Tauopathie-Mausmodellen unabhängig von NFTs (Rocher et al., 2010; Yoshiyama et al., 2007). Darüber hinaus zeigt die Ablagerung unlöslichen Tau-Proteins nicht notwendiger Weise Auswirkungen auf die Spine-Dichte und -Morphologie (Shahani et al., 2006). Auf der anderen Seite gibt es jedoch Belege für die Existenz neurotoxischer präfibrillärer Tau-Dimere und -Oligomere höherer Ordnung in Tauopathien wie der AD (Lasagna-Reeves et al., 2012; Patterson et al., 2011; Ward et al., 2012).

4.2 Methodische Aspekte

4.2.1 Restriktionen der Synapsendichte-Untersuchungen an Gehirnpräparaten

Die in Kapitel 4.1.1 diskutierten intravitalmikroskopischen Analysen dendritischer Spines in homozygoten Tau P301S-Mäusen konnten durch ergänzende immunhistochemische Untersuchungen an Gehirnschnitten nicht unterstützt werden: Der Vergleich PSD-95-, Synapsin1/2- bzw. Synaptophysin-immunoreaktiver synaptischer Spezialisierungen zeigte keine Dichteunterschiede zwischen Tau- und Wildtyp-Mäusen – weder in den kortikalen Schichten I/II, noch in verschiedenen hippocampalen Regionen (Stratum Radiatum und Stratum Oriens) oder dem besonders viele Phospho-Tau-Aggregate aufweisenden entorhinalen Kortex. Dies steht in Übereinklang mit einer ähnlichen Studie an einem weiteren *MAPT*-transgenen Mausmodell (Kopeikina et al., 2013), in welcher sich ebenfalls intravitalmikroskopisch ermittelte Verringerungen der Spine-Dichte nicht in immunhistochemischen Synapsendichte-Auswertungen widerspiegeln. Die erfolglose Suche nach synapsenschädigenden Tauopathie-Effekten an Gehirnpräparaten lässt sich auf verschiedene Ursachen zurückführen:

Zum einen wurden bei der intravitalmikroskopischen Untersuchung gezielt einzelne Dendritenäste von Schicht V Neuronen ausgewählt (Kriterien siehe Kapitel 2.3.2). Somit beziehen sich die erhobenen Daten auf höchstens ein Dutzend Dendriten respektive Neuronen pro Maus, während Schnittanalysen Aussagen über größere Einheiten des gesamten Nervennetzwerks erlauben. Kleine Effekte, die eventuell nur bestimmte Neuronenpopulationen betreffen, könnten dabei nicht mehr detektierbar bzw. durch kompensatorische Reaktionen benachbarter Zellen wie eine vermehrte Spine-Ausbildung überlagert sein.

Außerdem verursachte die Verwendung *YFP*-transgener Mäuse für die Antikörper-basierte Schnittanalyse Schwierigkeiten beim Markieren exzitatorischer Postsynapsen. Dendritische Spines – besonders der mushroom-Klasse – bilden vom Dendritenschaft separierte Zellkompartimente. Im Falle *YFP*-exprimierender Neuronen sind diese zusätzlich zu den eng gepackt vorliegenden Proteinen der postsynaptischen Verdichtung (z. B. PSD-95) und des Spine-Apparates auch mit dem fluoreszierenden Transgenprodukt gefüllt. Dies kann durch Blockieren sonst freiliegender Epitope zu einer Beeinträchtigung der spezifischen Antikörperbindung führen und resultiert so in fehlender PSD-95-Immunoreaktivität *YFP*-positiver dendritischer Spines. Ähnliche Probleme wurden auch von anderen Forschungsgruppen berichtet (Kremer et al., 2012). Da jedoch kein signifikanter Einfluss der interindividuellen *YFP*-Expressionsunterschiede auf die Postsynapsendichte-Messungen gefunden wurde, ist davon auszugehen, dass die Analyse der PSD-95-Färbung die

tatsächliche Postsynapsendichte in allen Tieren bzw. Mauslinien in ähnlicher Größenordnung unterschätzt.

Besonderes Augenmerk bei Synapsenuntersuchungen mittels Dichtemessungen sollte schließlich auf die Gewebeschrumpfung durch Neuronenverlust gelegt werden (Hildebrandt et al., 2011). Im Gehirngewebe neurodegenerativer Modelle kann dieser Faktor derart einflussreich sein, dass selbst starker Synapsenverlust durch (quasi ausgleichende) Schrumpfung der Bezugsfläche nicht als Dichteabnahme messbar ist. Homozygote Tau P301S-Mäuse erleiden massive Neurodegeneration in den oberen kortikalen Schichten (Hampton et al., 2010). Unter Annahme einer resultierenden kortikalen Atrophie wären die im Rahmen der vorliegenden Studie ermittelten Dichtewerte neu zu interpretieren: Die in Wildtyp- und Tau-Mäusen gemessenen nahezu identischen kortikalen Prä- und Postsynapsendichten würden bei Berücksichtigung einer Gewebeschrumpfung in letzteren einen entsprechenden Netto-Verlust synaptischer Spezialisierungen ergeben.

4.2.2 Restriktionen der chronischen Intravitalmikroskopie

Auch die hier präsentierten intravitalmikroskopischen Langzeitstudien kortikaler dendritischer Spines und Neuronensomata werden durch methodische Restriktionen erschwert, welche bei einer Diskussion der gewonnenen Daten in Betracht gezogen werden sollten. Generell stellt der Einbau eines chronischen kraniellen Glasfensters einen invasiven Eingriff dar, welcher zahlreiche unerwünschte Effekte hervorrufen kann. Selbst bei routinierter Arbeitsweise durch einen erfahrenen Experimentator verursacht das partielle Entfernen der Schädeldecke eine akute lokale Entzündungsreaktion. Während die Aktivierung residierender Mikrogliazellen in der Regel nach wenigen Tagen abgeklungen ist, kann eine Gliose durch rekrutierte Astrogliazellen mehrere Wochen andauern (Holtmaat et al., 2009). Daher sollte – wie in der hier vorgestellten Studie – eine mindestens 3-wöchige Erholungszeit zwischen Fenstereinbau und ersten mikroskopischen Aufnahmen eingehalten werden (siehe Kapitel 2.3.1).

Eine Alternativmethode zum kompletten Entfernen eines Teils des Schädelknochens stellt dessen Ausdünnung auf ca. 20 μm dar (Holtmaat et al., 2009; Yang et al., 2010). Das rasche Nachwachsen des Schädelknochens, welches ein wiederholtes Freilegen vor jeder Mikroskopie-Sitzung erforderlich macht und somit Langzeitstudien erschwert, kann durch zusätzliches Implantieren eines Glasplättchens vermieden werden (Marker et al., 2010). Da die Gehirnoberfläche bei dieser Fenstervariante nicht eröffnet wird, können lokale inflammatorische Prozesse reduziert werden. Im Vergleich zum Entfernen der Schädeldecke ist der dabei freigelegte Gehirnbereich jedoch mit meist weniger als 0,5 mm^2 deutlich kleiner.

Das Auffinden geeigneter Strukturen wird dadurch behindert – insbesondere bei spärlicher Markerproteinexpression, wie z. B. in der GFP-M Mauslinie (Feng et al., 2000). Zudem ist die messbare Signaltiefe stärker limitiert. Beim direkten Vergleich von Daten, welche mittels unterschiedlicher Fensterpräparationen erhoben wurden, gilt zu beachten, dass die Fenstervariante Einfluss auf die gemessene Umsatzrate dendritischer Spines haben kann (Xu et al., 2007). Aufgrund der benannten Nachteile wurde die Schädelknochen-Ausdünnungstechnik nicht angewendet.

Selbstverständlich muss stets höchste Priorität auf die Vermeidung von Stress-Situationen für die Versuchstiere gelegt werden – nicht zuletzt, da sich chronischer Stress negativ auf die Synapsen- bzw. Spine-Dichten auswirken kann (Liu und Aghajanian, 2008). Auch die Verwendung von Anästhetika bzw. Narkotika kann physiologische Vorgänge beeinflussen. So wurde gezeigt, dass die Verabreichung des NMDA-Rezeptor Antagonisten Ketamin die Spine-Anzahl erhöhen und Stress-induzierten Spine-Verlust umkehren kann (Li et al., 2010, 2011). Die alternative Isofluran-Narkose hingegen kann die Amyloid-Pathologie und Tau-Phosphorylierung in AD-Mausmodellen verstärken (Dong et al., 2012; Perucho et al., 2010; Planel et al., 2009). Zur Stress- bzw. Belastungs-Minimierung wurden die Mäuse daher höchstens zwei Mal wöchentlich untersucht mit 2-3 täglichen Ruhepausen, wobei eine Mikroskopie-Sitzung und entsprechend die Narkosedauer nicht länger als eine Stunde betrug.

Die permanente Körpertemperatur-Aufrechterhaltung des betäubten Tieres ist insbesondere wichtig beim Untersuchen von Tauopathien, da diese einen direkten Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus des Tau-Proteins hat. Im Fall einer Hypothermie führt inhibierte Kinase-Aktivität zu einer Tau-Hyperphosphorylierung im Gehirn der Mäuse (Planel et al., 2007). Für Winterschlaf haltende Tiere stellt dieser reversible Mechanismus eine essenzielle Adaptation an den Ruhezustand während der Hibernation dar (Arendt et al., 2003). Um einer Unterkühlung vorzubeugen, wurden die im Rahmen der vorliegenden Studie zum Fenstereinbau und zur Intravitalmikroskopie narkotisierten Mäuse permanent mittels Heizkissen oder Inkubator gewärmt (siehe Kapitel 2.3.1 und 2.3.2).

Neben der Operation zur Fensterimplantation und dem schonenden Umgang mit den Versuchstieren stellt auch die Auswahl der Reportermauslinie einen kritischen Faktor in der Intravitalmikroskopie dar. Die spezifische Markergenexpression limitiert dabei die Selektionsmöglichkeiten zur Analyse von neuronalen Strukturen wie Dendritenabschnitten oder Zellkörpern. Dies gilt auch für die hier präsentierte Untersuchung YFP-exprimierender Somata, welche keinen Verlust von Schicht II/III Pyramidenneuronen nachweisen konnte. Dieses Ergebnis lässt somit offen, ob tatsächlich kein Zelltod stattfand, denn potenzielle neurodegenerative Vorgänge in YFP-negativen Neuronenpopulationen blieben hierbei ausnahmslos im Dunkeln.

Im Bewusstsein und unter Beachtung der genannten Restriktionen ermöglicht die chronische Intravitalmikroskopie aussagekräftige und alternativlose experimentelle Untersuchungen neurobiologischer Fragestellungen. Dass derartige Studien nicht nur Antworten liefern, sondern meist zugleich ein Vielfaches an neuen Fragen aufwerfen, liegt in der Natur wissenschaftlicher Forschung. Durch die stets begrenzte Aussagekraft von Modellorganismen und permanente Weiterentwicklung von Analysetechniken stellen Forschungsergebnisse meist nur Etappenziele dar in einem vielleicht endlosen Lern- bzw. Erkenntnisprozess – ermöglicht nicht zuletzt durch die synaptische Plastizität der Neuronen in jedem gesunden Forschergehirn.

4.3 Die Rolle von Mikrogliazellen in Tauopathien

Mikrogliazellen wird in Tauopathien wie der AD eine ambivalente Rolle zuteil, ein Spektrum von neuroprotektiven bis hin zu -degenerativen Effekten umfassend (Dickson, 1999; Hanisch und Kettenmann, 2007). Ein kritischer Faktor ist dabei der Aktivierungsstatus der Mikrogliazellen, welcher u. a. durch Interaktion mit Neuronen reguliert wird. Genetische Reduktion bzw. Deletion des Fraktalkinrezeptors CX₃CR1 stört diese Kommunikation und bewirkt eine Überaktivierung der Mikrogliazellen (Bhaskar et al., 2010).

Im Tau P301S-Mausmodell führte dies zu einer tendenziellen Verminderung der kortikalen Tau-Pathologie. Die Dichtewerte Phospho-Tau (Antikörper AT8) enthaltender Zellen im visuellen und auditorischen Kortex waren nach *Cx3cr1*-Knockout sowohl in 12 Monate alten heterozygoten als auch in 5-6 Monate alten homozygoten Tau-Mäusen um etwa die Hälfte reduziert gegenüber *Cx3cr1*-Wildtyp Tieren. *Cx3cr1*-Heterozygotie bewirkte höchstens eine leichte Dichteabnahme. Wenngleich diese Unterschiede aufgrund hoher interindividueller Abweichungen keine statistische Signifikanz erreichten, steht der ermittelte Trend dennoch im Widerspruch zu bisherigen Studien:

So verstärkt eine Fraktalkinrezeptor-Defizienz die Tau-Hyperphosphorylierung in anderen *MAPT*-transgenen und *APP*-transgenen Mäusen (Bhaskar et al., 2010; Cho et al., 2011). Ähnliche Fraktalkin-abhängige Effekte wurden für AD-Rattenmodelle beschrieben (Hebron et al., 2013). Auch in Mausmodellen systemischer Inflammation, der Parkinson-Krankheit oder Amyotropher Lateralsklerose bewirkt eine Fraktalkinrezeptor-Defizienz eine erhöhte Neurotoxizität (Cardona et al., 2006). Umgekehrt reduziert eine Fraktalkin-Überexpression die Tau-Pathologie inklusive Neuronenverlust in einem weiteren Tauopathie-Mausmodell bei verminderter Aktivität der Mikrogliazellen (Nash et al., 2013). ZNS-

Entzündungsprozesse in 3xTg-AD Mäusen induzieren eine Tau-Hyperphosphorylierung durch Aktivierung spezifischer Kinasen (Kitazawa et al., 2005). Zudem korreliert die erhöhte Aktivität von Mikrogliazellen in den hier untersuchten Tau P301S-Mäusen sowie in FTDP-17-Patienten mit einer P301S *MAPT*-Mutation mit pathologischen Tau-Ablagerungen und Neurodegeneration (Bellucci et al., 2004, 2011). In Übereinstimmung mit diesen Befunden wurden kürzlich entzündungsfördernde Varianten eines weiteren Mikrogliazellen-assoziierten Gens, *TREM2*, als Risikofaktoren für Frontotemporale Demenz oder AD identifiziert (Guerreiro et al., 2012, 2013; Jonsson et al., 2013). Zusammengefasst weisen all diese Studien darauf hin, dass ein erhöhter Aktivierungsstatus der Mikrogliazellen, ausgelöst beispielsweise durch Deletion des Fraktalkinrezeptors, neuropathologische bzw. -degenerative Prozesse in Tauopathien verstärkt.

Andererseits konnte gezeigt werden, dass eine Fraktalkinrezeptor-Defizienz Nervenzellverlust im Kortex von 3xTg-AD Mäusen verhindert (Fuhrmann et al., 2010), was jedoch nicht notwendiger Weise mit einer verminderten Tau-Pathologie einhergehen muss. Neuroprotektive Effekte ruft eine Deletion des Fraktalkinrezeptors auch in einem Mausmodell zerebraler Ischämie hervor (Dénes et al., 2008). Außerdem wurden positive Auswirkungen einer erhöhten Phagozytose-Aktivität der Mikrogliazellen auf die A β -Pathologie und kognitive Beeinträchtigungen in AD-Mausmodellen gefunden (Lee und Landreth, 2010; Lee et al., 2010; Yamanaka et al., 2012). Somit können durch Mikrogliazellen vermittelte Entzündungsreaktionen im Falle der AD gegensätzliche Effekte auf Tau- und A β -Pathologie bewirken (Ghosh et al., 2013).

Die Diskrepanzen zwischen den hier präsentierten Befunden und den Ergebnissen vorheriger Studien liegen möglicher Weise begründet in den unterschiedlichen Studiendesigns: Im Tau x CXCR-Mausmodell wurde (als Vorarbeit einer ggf. anschließenden intravitalmikroskopischen Analyse) der Neokortex untersucht, während viele andere Studien Effekte in der Hippocampus-Formation beschreiben (Bhaskar et al., 2010; Cardona et al., 2006; Kitazawa et al., 2005). Die Verwendung des konventionellen Phospho-Tau-Antikörpers AT8 als Marker der Tau-Pathologie findet zwar Entsprechung in anderen Studien; eine Quantifizierung der Dichte AT8-positiver Zellen im Kortex erwies sich jedoch als ungeeignet, um statistisch signifikante Effekte zu messen. Daher konnte lediglich – speziell für die untersuchten kortikalen Regionen sowie die Retina – eine tendenzielle Verminderung der Tau-Pathologie durch Fraktalkinrezeptor-Modifizierung ermittelt und dadurch die suggerierte Verstärkung ausgeschlossen werden. Zur eindeutigen Klärung der Rolle von Mikrogliazellen in Tauopathien bzw. im Tau P301S-Mausmodell sind ergänzende Untersuchungen notwendig.

4.4 Kritische Betrachtung der Amyloid-Kaskaden-Hypothese

Zahlreiche neurodegenerative Erkrankungen mit charakteristischen Tau-Ablagerungen in Abwesenheit von A β -Pathologie zeigen, dass Veränderungen im Tau-Metabolismus alleine ausreichend sind, um synaptische Fehlfunktionen und neuronale Beeinträchtigungen bis hin zum Zelltod hervorzurufen (Morris et al., 2011; Spire-Jones et al., 2009). In der AD hingegen wird der Tau-Pathologie eine sekundäre Rolle zugeteilt – der als kausativ angesehenen A β -Pathologie in einer kaskadenartigen Wirkungskette untergeordnet (Haass, 2010; Hardy und Selkoe, 2002). Dementsprechend wurde nach Verpaarung der Tau-Mäuse mit der Linie APP PS1 eine Verstärkung der Tau-Pathologie sowohl in Form histologischer Läsionen als auch krankhafter Veränderungen dendritischer Spines erwartet.

4.4.1 Histologische Läsionen I: Tau- und A β -Pathologie

Ein Vergleich der Tau- und A β -Pathologie in Tau-, APP PS1- und Tau x APP PS1-Mäusen zeigte keine Unterschiede bezüglich der Anzahl Phospho-Tau enthaltender Zellkörper sowie der Dichte, mittleren Größe und Größenverteilung amyloider A β -Plaques. Da die Analyse auf intravitalmikroskopisch zugängliche kortikale Gebiete begrenzt war, ist jedoch nicht auszuschließen, dass in anderen Regionen wie beispielsweise dem Hirnstamm synergistische Effekte in Tau x APP PS1-Mäusen auftreten. Zudem waren möglicherweise spezifische Verstärkungen der Tau-Pathologie durch Verwendung des konventionellen Phospho-Tau Antikörpers AT8 nicht zu detektieren. Somit könnten dutzende weitere Epitope des Proteins hyperphosphoryliert vorliegen oder zahlreiche andere biochemische Tau-Modifikationen stattfinden wie beispielsweise proteolytische Prozessierung, Ubiquitinierung oder Acetylierung (Mandelkow und Mandelkow, 2012).

Neben regionalen und qualitativen Unterschieden der Tau-Pathologie ist auch das Untersuchungsalter der Tiere und somit der zeitliche Verlauf der Erkrankung ein kritischer Faktor. Es wurden 9 Monate alte Kohorten untersucht, da in diesem Alter heterozygote Tau-Mäuse erste Ansammlungen hyperphosphorylierten Tau-Proteins in vereinzelt kortikalen Zellen aufwiesen. Die A β -Pathologie setzt in APP PS1-Mäusen bereits deutlich früher ein, im Alter von 4-6 Monaten (Jankowsky et al., 2004; Garcia-Alloza et al., 2006). Gemäß der Amyloid-Kaskaden-Hypothese wäre in Tau x APP PS1-Mäusen ein vorgezogener Beginn der Tau-Ablagerungen und/oder eine Gesamtverstärkung der Pathologie zu erwarten, die insbesondere in frühen Krankheitsstadien offenkundig wird. Um derartige Effekte vollständig auszuschließen, müssten zusätzlich ältere Tiere histologisch untersucht werden.

Die Amyloid-Kaskaden-Hypothese wird durch die Ergebnisse verschiedener Studien unterstützt. In 3xTg-AD-Mäusen geht die Ablagerung extrazellulärer A β -Plaques den intrazellulären Tau-Aggregaten voraus (Oddo et al., 2003a und 2003b). Auch in einem kürzlich erzeugten AD-Rattenmodell, welches ähnlich der APP PS1-Mauslinie humanes APP_{SWE} und PS1 Δ E9 exprimiert, manifestiert sich zunächst zerebrale Amyloidose, bevor Tau-Ansammlungen, Gliose, Neurodegeneration und kognitive Beeinträchtigungen folgen (Cohen et al., 2013). Zudem konnte mehrfach eine A β -induzierte Verstärkung der Tau-Pathologie in AD-Mausmodellen nachgewiesen werden: Verpaaren einer *MAPT*-transgenen Linie mit einem A β -Mausmodell resultiert in erhöhter Tau-Aggregation in einzelnen Gehirnregionen bei weitestgehend unveränderter A β -Pathologie (Lewis et al., 2001). Eine NFT-Zunahme im gleichen Tauopathie-Mausmodell kann ebenfalls durch zerebrale Injektion von A β ₄₂-Fibrillen erzeugt werden (Götz et al., 2001). Andererseits führt eine A β -Immuntherapie bei 3xTg-AD-Mäusen neben einer Abnahme von Plaques und intrazellulärem A β auch zu einer Verzögerung der frühen Tau-Pathologie (Oddo et al., 2004). In ähnlicher Weise bewirkt die genetische Reduktion löslicher A β -Oligomere in einem weiteren AD-Mausmodell eine verringerte Ansammlung und Phosphorylierung des Tau-Proteins (Chabrier et al., 2012). Die Reduktion endogenen Tau-Proteins hingegen verbessert A β -induzierte Verhaltensdefizite in *APP*-transgenen Mäusen und schützt diese vor Exzitotoxizität bei unverändert hohem A β -Spiegel (Roberson et al., 2007).

Funktionelle Untersuchungen geben Hinweise auf vielfältige molekulare und zelluläre Mechanismen, durch welche A β die Tau-Pathologie fördern kann. Dazu zählen die direkte Aktivierung spezifischer Tau-Kinasen bzw. die Inhibition von Tau-Phosphatasen, inflammatorische Prozesse, Beeinträchtigungen der Proteindegradierung im Ubiquitin-Proteasom-System oder via Autophagie, sowie Störungen des axonalen Transports (Blurton-Jones und LaFerla, 2006).

Verlässt man nun Tiermodellsysteme und vergleicht stattdessen die zeitliche und räumliche Ausbreitung der humanen A β - und Tau-Pathologie, ergibt sich hingegen ein anderes Bild: Hier finden sich Ablagerungen hyperphosphorylierten Tau-Proteins bereits in 20- bis 30-jährigen Autopsie-Fällen, während A β -Plaques erst deutlich später, ca. ab dem 50. Lebensjahr, auftreten (Braak et al., 2011). Kognitive Beeinträchtigungen von AD-Patienten korrelieren am besten mit der Tau-Pathologie (Braak und Braak, 1991). Zudem gibt es regionale Unterschiede der Proteinablagerungen, auf welchen auch die AD-Stadieneinteilung beruht (Arnold et al., 1991; Braak und Braak, 1991): Beginnend im transentorhinalen Kortex (Stadien I-II), setzt sich die stereotype Tau-Pathologie im limbischen System fort (Stadien III-IV), bevor schließlich auch Regionen des (assoziativen) Neokortex betroffen sind (Stadien V-VI). Die primären sensorischen, motorischen und visuellen Areale bleiben dabei bis zuletzt weitestgehend ausgespart von NFTs oder

Neurofibrillen. Weniger klar definiert ist die Ausbreitung der A β -Plaque-Pathologie, welche zudem starke interindividuelle Schwankungen aufweist (Braak und Braak, 1991). Amyloide Plaque-Ablagerungen formen sich meist zuerst im Neokortex, greifen dann über auf das limbische System und schließlich auch auf subkortikale Regionen wie das Kleinhirn und den Hirnstamm (Thal et al., 2002). Dabei kann kein allgemeiner Zusammenhang zwischen der A β -Pathologie und Gehirnatrophie oder -hypometabolismus in AD-Patienten ermittelt werden (La Joie et al., 2012). Die Ausbreitung der amyloiden A β - und Tau-Aggregate beruht möglicher Weise auf Prion-artigen Pathomechanismen (Aguzzi und Rajendran, 2009). Zudem gibt es Hinweise darauf, dass die Sekretion und Aggregation dieser Proteine aktivitätsabhängig ist (Beker et al., 2012; Cirrito et al., 2005; Pooler et al., 2013).

Entgegen der Amyloid-Kaskaden-Hypothese scheinen sich im Gehirn von AD-Patienten also A β - und Tau-Pathologie zeitlich und räumlich unabhängig voneinander zu entwickeln. Daher ist es wenig erstaunlich, dass selbst die hohe Dichte kortikaler neuritischer Plaques im Tau x APP PS1-Mausmodell keinen direkten Einfluss auf die Tau-Pathologie in Form verstärkter somatodendritischer Protein-Ablagerungen zeigte.

4.4.2 Histologische Läsionen II: Neuritische Dystrophien

Pathologische Veränderungen der Nervenzellmorphologie wie neuritische Dystrophien gehen oftmals dem Absterben von Neuronen voraus. Sie sind typische neurodegenerative Merkmale im Gehirngewebe von AD-Patienten, wo sie in unmittelbarer Umgebung oder innerhalb neuritischer Plaques, aber auch im Neuropil abseits von Plaques gefunden werden (Masliah et al., 1993; Probst et al., 1983; Stokin et al., 2005). Axonale Schädigungen treten auf in Form von Anschwellungen mit Ansammlungen von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen, Motorproteinen, Organellen und Vesikeln, was zu Transportdefiziten führt (Stokin et al., 2005). Auch dendritische Veränderungen wie Spine-Verlust, Atrophien, Biegungen, abruptes Enden eines Astes oder das Entstehen neuer Verzweigungen werden hervorgerufen (Ferrer et al., 1990; Grutzendler et al., 2007; Paula-Barbosa et al., 1980).

Die hier untersuchten AD-Mausmodelle APP PS1, Tau x APP PS1 und 3xTg-AD wiesen ähnliche Läsionen auf. Neuritische Dystrophien konnten dabei sowohl axonalen als auch dendritischen Ursprungs sein und Ansammlungen von A β - und Tau-Proteinen, aber auch Vakuolen-förmige Organellen enthalten. Die Größen der Anschwellungen waren sehr variabel und schwanken oftmals über einen längeren Zeitraum, ohne sofortigen Zelltod zu verursachen. Viele der gehäuft auftretenden Plaque-assoziierten Dystrophien enthielten Phospho-Tau. Sie waren besonders zahlreich in der Nähe großer Plaques und dabei tendenziell häufiger in Tau x APP PS1-Mäusen als in deren Wurfgeschwistern ohne *MAPT*-

Transgen. In Übereinstimmung mit der Amyloid-Kaskaden-Hypothese spricht dies für eine milde Verstärkung der Plaque-bedingten Gewebeschäden durch Expression des humanen mutierten Tau-Proteins, das dabei aber nicht notwendig ist für die Entstehung der Anschwellungen.

Viele Tauopathie-Mausmodelle entwickeln axonale Pathologie, welche sowohl durch fehlende Mikrotubuli-Stabilisierung als auch toxische Effekte der ungebundenen Tau-Proteine hervorgerufen werden kann (Higuchi et al., 2002). Dystrophe Axone entfernt von Plaques und in Abwesenheit von Tau-Pathologie finden sich jedoch auch in *APP/PS1*-transgenen Mäusen (Wirths et al., 2006) – ebenso wie Plaque-assoziierte neuritische Dystrophien mit Phospho-Tau Ablagerungen (Blanchard et al., 2003). Somit können sowohl Veränderungen im A β - als auch Tau-Metabolismus alleine oder synergistisch neuritische Schädigungen hervorrufen.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten dichte Anlagerungen von Phospho-Tau an Mitochondrien in 3xTg-AD-Mäusen. Mitochondriale Beeinträchtigungen in Form von Ansammlungen von Proteinen der Zellatmungskette, axonalen Transportdefiziten und damit einhergehenden Mitochondrien-Fehlverteilungen werden in AD-Patienten und verschiedenen Tauopathiemodellen gefunden und sind auch mit dystrophen Neuriten assoziiert (Blanchard et al., 2003; Kopeikina et al., 2011; Plucinska et al., 2012). Derartige mitochondriale Dysfunktionen sowie oxidativer Stress treten bereits in frühen Stadien neurodegenerativer Erkrankungen auf und fördern die Pathogenese (Lin und Beal, 2006). Sowohl A β - als auch Tau-Proteine können mit Bestandteilen der Atmungskette in der Mitochondrienmembran interagieren und synergistisch mitochondriale Funktionen stören (Götz et al., 2012).

Einige Befunde zu neuritischen Dystrophien in AD-Patienten und -Modellen stellen zentrale Annahmen der Amyloid-Kaskaden-Hypothese in Frage: Erste axonale Defekte können lange vor amyloiden Plaques auftreten und durch Mikrotubuli-abhängige Transportdefizite die A β -Produktion verstärken; daher werden alternativ die axonale Pathologie und Zytoskelettveränderungen als kausale Primärereignisse suggeriert (Stokin et al., 2005; Terry, 1996). Eine protektive Rolle des Tau-Proteins demonstriert eine andere Studie, wonach *Mapt*-Knockout in *APP*-transgenen Mäusen eine Dystrophien-Verstärkung bewirkt (Dawson et al., 2010). Zu den ersten neuropathologischen AD-Läsionen zählen außerdem Fehlfunktionen im Endosomen-Lysosomen-System, welche wiederum neuronale Dystrophien hervorrufen und zudem die A β -Pathologie fördern können (Nixon, 2005). Störungen der neuronalen Homöostase in neurodegenerativen Erkrankungen lassen sich auch auf Veränderungen im Autophagosomen-System zurückführen (Wong und Cuervo, 2010). Während autophagische Proteolyse im humanen Gehirn alterungsbedingt herunterreguliert wird, kann in AD-Patienten eine womöglich kompensatorische Verstärkung der Autophagie gemessen werden (Lipinski et al., 2010). Die YFP-negativen Einschlüsse

und großen Organellen in den hier analysierten Mauslinien, welche teilweise A β - und Tau-Proteine enthielten, könnten daher Ansammlungen vergrößerter früher Endosomen oder Autophagosomen sein (Israel et al., 2012).

Bei der Untersuchung YFP-transgener Mäuse ist zu beachten, dass auch die Langzeitexpression des Fluorophors axonale Anschwellungen hervorrufen kann. In alten Tieren der YFP-H Linie wurden derartige Dystrophien jedoch nur für Regionen abseits des Neokortex oder Hippocampus beschrieben (Bridge et al., 2009). Außerdem können infolge der Fensterimplantation oder aufgrund von Laserlicht-induzierter Phototoxizität Gewebeschäden auftreten, welche sich in ähnlicher Form äußern. Daher sollten histochemische Untersuchungen an nicht-operierten Tieren durchgeführt werden. Zusätzliche Analysen YFP-negativer Tiere zur Evaluierung der Läsionen sind ratsam.

4.4.3 Einfluss von Tau- und A β -Pathologie auf dendritische Spines

Kognitive Beeinträchtigungen in AD-Patienten korrelieren am besten mit der Synapsendichte, wobei der Verlust synaptischer Verbindungen dem Absterben von Nervenzellen vorangehen kann (Scheff und Price, 2003). Es lassen sich synaptotoxische Effekte in der Nähe und entfernt von A β -Plaques unterscheiden.

Innerhalb und in unmittelbarer Umgebung neuritischer Plaques treten synaptische Schädigungen auf, welche sich u. a. in einer anormalen Morphologie und verringerten Dichte dendritischer Spines äußern (Probst et al., 1983; Spires et al., 2005; Spires-Jones et al., 2007; Bittner et al., 2010). Messungen in der hier erzeugten Mauslinie Tau x APP PS1 wiesen hingegen keine Korrelation zwischen Spine-Dichte und Plaque-Abstand auf, selbst in 12 Monate alten Tieren mit zahlreichen kortikalen Plaque-Ablagerungen. In Anbetracht der starken Streuung der Spine-Dichtewerte war möglicher Weise die Anzahl der untersuchten Dendritenabschnitte zu gering, um kleine Effekte zu detektieren. Der Spine-Verlust setzt erst nach der Plaque-Entstehung ein und kann über mehrere Monate andauern (Bittner et al., 2012). Die durchgeführte Einzelzeitpunkt-Analyse kann daher eine spätere Spine-Reduktion in Plaque-Nähe nicht ausschließen.

Um den Einfluss von Tau- und A β -Pathologie auf die Plastizität und Morphologie dendritischer Spines zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Studie kortikale Regionen entfernt von A β -Plaques ausgewählt. Obwohl die Spine-Dichtewerte von Wildtyp-, Tau- und Tau x APP PS1-Mäusen nicht differierten, wiesen repetitive Analysen Unterschiede in der Spine-Kinetik auf: In 12 Monate alten Tau-Mäusen, nicht jedoch in Tau x APP PS1-Mäusen, nahm die Spine-Dichte innerhalb von 14 Tagen ab – zurückzuführen auf ein Ungleichgewicht verlorener und neuer Spines zugunsten ersterer. Vorherige Untersuchungen 4 Monate alter

homozygoter Tau-Mäuse brachten ähnliche Ergebnisse, was für einen konzentrationsabhängigen Tauopathie-Effekt spricht. Während in 8 Monate alten Tau x APP PS1-Mäusen die Dichte neuer Spines gegenüber Wildtyp-Tieren verringert war, zeigten ältere Tiere eine vermehrte Ausbildung neuer Spines, welche jedoch durch eine ebenfalls erhöhte Dichte verlorener Spines ausgeglichen wurde. Die über den Untersuchungszeitraum unveränderte Spine-Dichte in alten Tau x APP PS1-Mäusen deutet daher auf einen altersabhängigen Effekt der *APP-PS1*-Transgene hin, welcher den synaptotoxischen Effekten der *MAPT*-Expression entgegenwirkt und die geringere Spine-Neubildung kompensiert. Diese Annahme wird unterstützt durch Studien an Mäusen, die humanes Wildtyp oder FAD-mutiertes Präsenilin 1 exprimieren und eine Zunahme dendritischer Spines von Schicht V Pyramidenneuronen zeigen (Jung et al., 2011). Synergistische Effekte der A β - und Tau-Pathologie, wie sie die Amyloid-Kaskaden-Hypothese suggeriert, waren hingegen nicht zu messen. Ebenso waren Veränderungen der Spine-Morphologie, primär in Form einer verringerten mushroom Spine-Fraktion, in Tau x APP PS1-Mäusen gegenüber Tau-Mäusen nicht verstärkt.

Auch im Gehirngewebe von AD-Patienten manifestieren sich pathologische synaptische Veränderungen im Neuropil abseits von Plaques (Scheff und Price, 2003). Hinweise auf Einfluss und Wirkungsweise der A β -Pathologie geben zahlreiche Untersuchungen an AD-Mausmodellen, welche humane *APP*- oder *PS1*-Transgene mit FAD-Mutationen exprimieren. Im Widerspruch zur oben zitierten Studie von Jung et al. (2011) zeigen sie zumeist eine altersbedingte Abnahme dendritischer Spines sowie Plastizitätsdefizite wie eine LTP-Verminderung und LTD-Verstärkung (Jung und Herms, 2012; Spires-Jones und Knafo, 2012). Anstelle einer allgemeinen Reduktion synaptischer Netzwerk-Aktivität findet sich ein prozentualer Anstieg sowohl hyperaktiver als auch ruhender Neuronen (Busche et al., 2008, 2012). Ähnlich wie in AD-Patienten, wird auch in vielen Mausmodellen – beispielsweise in der hier untersuchten APP PS1-Linie – ein erhöhtes Risiko für spontane epileptische Anfälle gemessen, welches sich auf eine neuronale Übererregbarkeit zurückführen lässt (Gurevicius et al., 2013; Minkeviciene et al., 2009). Dabei gelten lösliche A β -Oligomere, besonders in Form von Dimeren, als primäre synaptotoxische Spezies (Busche et al., 2012; Shankar et al., 2008). Der durch A β -Oligomere hervorgerufene Spine-Verlust ist reversibel und erfolgt via NMDA-Rezeptor-abhängige Signalwege (Kessels et al., 2013; Shankar et al., 2007, 2008). Sowohl die aktivitätsabhängige axonale als auch dendritische A β -Sekretion verursachen lokale Effekte (Wei et al., 2010), beispielsweise eine vermehrte Endozytose von AMPA-Oberflächenrezeptoren und damit einhergehend eine Schwächung synaptischer Verbindungen (Hsieh et al., 2006). Dies führt wiederum zu morphologischen Veränderungen wie einem kleineren Kopfvolumen und einer verringerten Halslänge dendritischer Spines

(Merino-Serrais et al., 2011; Oh et al., 2013). In ähnlicher Weise zeichneten sich Spines der hier untersuchten Tau x APP PS1-Mäuse durch eine geringere Halslänge und eine prozentuale Abnahme der mushroom Spine-Klasse aus.

Der Zusammenhang zwischen A β - und Tau-Pathologie in der AD ist noch immer in vielen Details ungeklärt, wurde in den letzten Jahren jedoch um eine neue Rolle des Tau-Proteins erweitert: Obwohl das Mikrotubuli-assoziierte Protein überwiegend axonal lokalisiert ist, suggerieren die Ergebnisse mehrerer Studien, dass Tau in dendritischen Spines (siehe Kapitel 4.1.2) kritisch in die Übermittlung A β -induzierter synaptotoxischer Effekte involviert ist (Hoover et al., 2010; Ittner et al., 2010; Zempel et al., 2010). Das zelluläre Prion-Protein und die Kinase Fyn fungieren als Verbindungsglieder zwischen A β - und Tau-Pathologie (Ittner und Götz, 2011; Ittner et al., 2010; Larson et al., 2012). Die Tau-Phosphorylierung an spezifischen Epitopen ist dabei notwendig für die Aktivierung synapsenschädigender Signalwege und dient als Regulationsmechanismus zum Vermeiden einer NMDA-Rezeptor Übererregbarkeit (Hong et al., 2012; Mairet-Coello et al., 2013; Mondragon-Rodriguez et al., 2012). Auch in Abwesenheit von A β -Pathologie kann die Fehllokalisierung hyperphosphorylierten Tau-Proteins in dendritische Spines eine Verminderung der Anzahl von AMPA- und NMDA-Oberflächenrezeptoren bewirken (Hoover et al., 2010). Eine Tau-Reduktion hingegen verhindert Synapsenverlust in AD-Mausmodellen und normalisiert die gestörte Balance zwischen Erregung und Inhibition (Roberson et al., 2007, 2011). Zudem führt ein *Mapt*-Knockout zu einer Abschwächung der Anfälle in Epilepsie-Tiermodellen (Holth et al., 2013). Dies spricht für eine zentrale Rolle des Tau-Proteins in der Regulierung intrinsischer Netzwerkerregbarkeit.

Synaptische Plastizitätsmechanismen werden zusätzlich durch Alterseffekte beeinflusst, welche sich nur schwer von Symptomen der A β - und Tau-Pathologie unterscheiden lassen. So sind kortikale dendritische Spines in jungen, wenige Wochen alten Mäusen weniger stabil, ihre Umsatzraten erhöht (Grutzendler et al., 2002). Auch die Morphologie der Spines ändert sich mit dem Alter, wobei das Spine-Volumen in gealterten, über 20 Monate alten Tieren geringer ist (Mostany et al., 2013). Präsynaptische axonale Boutons weisen in diesem Alter überraschender Weise eine verstärkte Dynamik auf – bei unbeeinflusster Größe und Dichte (Grillo et al., 2013). Die in der vorliegenden Studie untersuchten Alterskohorten von 8 und 12 Monaten sollten von derartigen Effekten jedoch nicht betroffen sein. Ein Vergleich mit gleichaltrigen Wildtyp-Tieren oder anderen Kontrollen desselben genetischen Hintergrunds (wenn möglich Wurfgeschwister) ist in jedem Fall unabdingbar.

4.4.4 Ausblick

Da die Mauslinie Tau x APP PS1 im Rahmen dieser Dissertation neu erzeugt wurde und an ihr neben den hier präsentierten noch keine weiteren Untersuchungen durchgeführt wurden, bleiben viele experimentelle Fragestellungen offen. So könnten beispielsweise durch elektrophysiologische und verhaltensbiologische Messungen von neuronaler (Spontan-) Aktivität, LTP, LTD, Lern- und Gedächtnisleistung funktionelle Beeinträchtigungen der Tiere detektiert und ggf. mit den beschriebenen Befunden korreliert werden. Zudem würden detaillierte biochemische Analysen, etwa an Synaptosomen-Präparationen von Gehirngewebe des AD-Modells und der Gründerlinien, Aufschluss geben über die synapsenschädigende Protein-Spezies sowie lokale Wirkmechanismen – auch im Hinblick auf eine Verifizierung der Amyloid-Kaskaden-Hypothese.

5. LITERATUR

Adamietz, J. (1993). Juvenal, Satiren. Lateinisch/Deutsch. Sammlung Tusculum. Artemis & Winkler, München/ Zürich.

Aguzzi, A., und Rajendran, L. (2009). The transcellular spread of cytosolic amyloids, prions, and prionoids. *Neuron* 64, 783–790.

Allen, B., Ingram, E., Takao, M., Smith, M.J., Jakes, R., Virdee, K., Yoshida, H., Holzer, M., Craxton, M., Emson, P.C., et al. (2002). Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein. *The Journal of Neuroscience* 22, 9340–9351.

Alzheimer, A. (1901). Krankenakte von Auguste Deter. *Archiv der Klinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie am Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main*.

Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-Gerichtliche Medizin* 64, 146–148.

Alzheimer, A. (1911). Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters. *Zeitschrift für die Gesamte Neurologie und Psychiatrie* 4, 356–385.

Ardiles, A.O., Tapia-Rojas, C.C., Mandal, M., Alexandre, F., Kirkwood, A., Inestrosa, N.C., und Palacios, A.G. (2012). Postsynaptic dysfunction is associated with spatial and object recognition memory loss in a natural model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 13835–13840.

Arellano, J.I., Espinosa, A., Fairén, A., Yuste, R., und DeFelipe, J. (2007). Non-synaptic dendritic spines in neocortex. *Neuroscience* 145, 464–469.

Arendt, T., Stieler, J., Strijkstra, A.M., Hut, R.A., Rüdiger, J., Van der Zee, E.A., Harkany, T., Holzer, M., und Härtig, W. (2003). Reversible paired helical filament-like phosphorylation of tau is an adaptive process associated with neuronal plasticity in hibernating animals. *The Journal of Neuroscience* 23, 6972–6981.

Arnold, S., Hyman, B., Flory, J., Damasio, A., und Van Hoesen, G. (1991). The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Cerebral Cortex* 1, 103–116.

Ashe, K.H., und Zahs, K.R. (2010). Probing the biology of Alzheimer's disease in mice. *Neuron* 66, 631–645.

Bateman, R., Xiong, C., Benzinger, T., Fagan, A., Goate, A., Fox, N., Marcus, D., Cairns, N., Xie, X., Blazey, T., et al. (2012). Clinical and biomarker changes in dominantly inherited alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine* 367, 795–804.

Batsch, N.L., und Mittelman, M.S. (2012). World Alzheimer Report 2012. Alzheimer's Disease International.

- Beker, S., Kellner, V., Kerti, L., und Stern, E.A. (2012). Interaction between amyloid- β pathology and cortical functional columnar organization. *The Journal of Neuroscience* 32, 11241–11249.
- Bellucci, A., Westwood, A.J., Ingram, E., Casamenti, F., Goedert, M., und Spillantini, M.G. (2004). Induction of inflammatory mediators and microglial activation in mice transgenic for mutant human P301S tau protein. *The American Journal of Pathology* 165, 1643–1652.
- Bellucci, A., Bugiani, O., Ghetti, B., and Spillantini, M. (2011). Presence of reactive microglia and neuroinflammatory mediators in a case of frontotemporal dementia with P301S mutation. *Neurodegenerative Diseases* 8, 221–229.
- Bessis, A., Béchade, C., Bernard, D., und Roumier, A. (2007). Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia* 55, 233–238.
- Bhaskar, K., Konerth, M., Kokiko-Cochran, O.N., Cardona, A., Ransohoff, R.M., und Lamb, B.T. (2010). Regulation of tau pathology by the microglial fractalkine receptor. *Neuron* 68, 19–31.
- Binder, L.I., Frankfurter, A., und Rebhun, L.I. (1985). The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *The Journal of Cell Biology* 101, 1371–1378.
- Bittner, T., Fuhrmann, M., Burgold, S., Ochs, S.M., Hoffmann, N., Mitteregger, G., Kretzschmar, H., Laferla, F.M., und Herms, J. (2010). Multiple events lead to dendritic spine loss in triple transgenic Alzheimer's disease mice. *PLOS ONE* 5, e15477.
- Bittner, T., Burgold, S., Dorostkar, M.M., Fuhrmann, M., Wegenast-Braun, B.M., Schmidt, B., Kretzschmar, H., und Herms, J. (2012). Amyloid plaque formation precedes dendritic spine loss. *Acta Neuropathologica* 124, 797–807.
- Blanchard, V., Moussaoui, S., Czech, C., Touchet, N., Bonici, B., Planche, M., Canton, T., Jedidi, I., Gohin, M., Wirths, O., et al. (2003). Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with A β deposits in APP/PS1 transgenic mice. *Experimental Neurology* 184, 247–263.
- Blazquez-Llorca, L., Garcia-Marin, V., Merino-Serrais, P., Ávila, J., und DeFelipe, J. (2011). Abnormal tau phosphorylation in the thorny excrescences of CA3 hippocampal neurons in patients with Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 26, 683–698.
- Blennow, K., Hardy, J., und Zetterberg, H. (2012). The neuropathology and neurobiology of traumatic brain injury. *Neuron* 76, 886–899.
- Blurton-Jones, M., und LaFerla, F. (2006). Pathways by which A β facilitates tau pathology. *Current Alzheimer Research* 3, 437–448.
- Bolmont, T., Clavaguera, F., Meyer-Luehmann, M., Herzig, M.C., Radde, R., Staufenbiel, M., Lewis, J., Hutton, M., Tolnay, M., und Jucker, M. (2007). Induction of tau pathology by intracerebral infusion of amyloid- β -containing brain extract and by amyloid- β deposition in APP x Tau transgenic mice. *The American Journal of Pathology* 171, 2012–2020.
- Braak, H., und Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica* 82, 239–259.

- Braak, H., Thal, D.R., Ghebremedhin, E., und Del Tredici, K. (2011). Stages of the pathologic process in Alzheimer disease: age categories from 1 to 100 years. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 70, 960–969.
- Brandt, R., Hundelt, M., und Shahani, N. (2005). Tau alteration and neuronal degeneration in tauopathies: Mechanisms and models. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1739, 331–354.
- Breitner, J., Gau, B., Welsh, K., Plassman, B., McDonald, W., Helms, M., und Anthony, J. (1994). Inverse association of anti-inflammatory treatments and Alzheimer's disease: initial results of a co-twin control study. *Neurology* 44, 227–232.
- Bridge, K.E., Berg, N., Adalbert, R., Babetto, E., Dias, T., Spillantini, M.-G., Ribchester, R.R., und Coleman, M.P. (2009). Late onset distal axonal swelling in YFP-H transgenic mice. *Neurobiology of Aging* 30, 309–321.
- Busche, M., Eichhoff, G., Adelsberger, H., Abramowski, D., Wiederhold, K.-H., Haass, C., Staufenbiel, M., Konnerth, A., und Garaschuk, O. (2008). Clusters of hyperactive neurons near amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Science* 321, 1686–1689.
- Busche, M., Chen, X., Henning, H., Reichwald, J., Staufenbiel, M., Sakmann, B., und Konnerth, A. (2012). Critical role of soluble amyloid- β for early hippocampal hyperactivity in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 8740–8745.
- Butko, M.T., Yang, J., Geng, Y., Kim, H.J., Jeon, N.L., Shu, X., Mackey, M.R., Ellisman, M.H., Tsien, R.Y., und Lin, M.Z. (2012). Fluorescent and photo-oxidizing TimeSTAMP tags track protein fates in light and electron microscopy. *Nature Neuroscience* 15, 1742–1751.
- De Calignon, A., Spire-Jones, T.L., Pitstick, R., Carlson, G. A., und Hyman, B.T. (2009). Tangle-bearing neurons survive despite disruption of membrane integrity in a mouse model of tauopathy. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 68, 757–761.
- Cardona, A.E., Pioro, E.P., Sasse, M.E., Kostenko, V., Cardona, S.M., Dijkstra, I.M., Huang, D., Kidd, G., Dombrowski, S., Dutta, R., et al. (2006). Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nature Neuroscience* 9, 917–924.
- Caroni, P. (1997). Overexpression of growth-associated proteins in the neurons of adult transgenic mice. *Journal of Neuroscience Methods* 71, 3–9.
- Caroni, P., Donato, F., und Muller, D. (2012). Structural plasticity upon learning: regulation and functions. *Nature Reviews Neuroscience* 13, 478–490.
- Chabrier, M.A., Blurton-Jones, M., Agazaryan, A.A., Nerhus, J.L., Martinez-Coria, H., und LaFerla, F.M. (2012). Soluble A β promotes wild-type tau pathology in vivo. *The Journal of Neuroscience* 32, 17345–17350.
- Chicurel, M., und Harris, K. (1992). Three-dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their synaptic relationships with mossy fiber boutons in the rat hippocampus. *The Journal of Comparative Neurology* 325, 169–182.
- Cho, S.-H., Sun, B., Zhou, Y., Kauppinen, T.M., Halabisky, B., Wes, P., Ransohoff, R.M., und Gan, L. (2011). CX3CR1 protein signaling modulates microglial activation and protects

against plaque-independent cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer disease. *The Journal of Biological Chemistry* 286, 32713–32722.

Cirrito, J.R., Yamada, K.A., Finn, M.B., Sloviter, R.S., Bales, K.R., May, P.C., Schoepp, D.D., Paul, S.M., Mennerick, S., und Holtzman, D.M. (2005). Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels in vivo. *Neuron* 48, 913–922.

Clavaguera, F., Bolmont, T., Crowther, R.A., Abramowski, D., Frank, S., Probst, A., Fraser, G., Stalder, A.K., Beibel, M., Staufenbiel, M., et al. (2009). Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nature Cell Biology* 11, 909–913.

Cohen, R., Rezai-Zadeh, K., Weitz, T., Rentsendorj, A., Gate, D., Spivak, I., Bholat, Y., Vasilevko, V., Glabe, C., Breunig, J., et al. (2013). A transgenic Alzheimer rat with plaques, tau pathology, behavioral impairment, oligomeric A β , and frank neuronal loss. *The Journal of Neuroscience* 33, 6245–6256.

Cummings, B., Su, J., Cotman, C., White, R., und Russell, M. (1993). Beta-amyloid accumulation in aged canine brain: a model of early plaque formation in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 14, 547–560.

Dawson, H.N., Cantillana, V., Vitek, M.P., Wilcock, D.M., Lynch, J.R., und Laskowitz, D.T. (2010). Loss of tau elicits axonal degeneration in a mouse model of AD. *Neuroscience* 169, 516–531.

Delobel, P., Lavenir, I., Fraser, G., Ingram, E., Holzer, M., Ghetti, B., Spillantini, M.G., Crowther, R.A., und Goedert, M. (2008). Analysis of tau phosphorylation and truncation in a mouse model of human tauopathy. *The American Journal of Pathology* 172, 123–131.

Dénes, A., Ferenczi, S., Halász, J., Környei, Z., und Kovács, K.J. (2008). Role of CX3CR1 (fractalkine receptor) in brain damage and inflammation induced by focal cerebral ischemia in mouse. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 28, 1707–1721.

Denk, W., Strickler, J.H., und Webb, W.W. (1990). Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248, 73–76.

Dickson, D.W. (1999). Microglia in Alzheimer's Disease and Transgenic Models. *American Journal of Pathology* 154, 1627–1631.

Dickstein, D.L., Brautigam, H., Stockton, S.D., Schmeidler, J., und Hof, P.R. (2010). Changes in dendritic complexity and spine morphology in transgenic mice expressing human wild-type tau. *Brain Structure & Function* 214, 161–179.

Dong, Y., Wu, X., Xu, Z., Zhang, Y., und Xie, Z. (2012). Anesthetic isoflurane increases phosphorylated tau levels mediated by caspase activation and A β generation. *PLOS ONE* 7, e39386.

Dorostkar, M.M., Dreosti, E., Odermatt, B., und Lagnado, L. (2010). Computational processing of optical measurements of neuronal and synaptic activity in networks. *Journal of Neuroscience Methods* 188, 141–150.

Edison, P., Archer, H., Gerhard, A., Hinz, R., Pavese, N., Turkheimer, F., Hammers, A., Tai, Y., Fox, N., Kennedy, A., et al. (2008). Microglia, amyloid, and cognition in Alzheimer's

disease: An [11C](R)PK11195-PET and [11C]PIB-PET study. *Neurobiology of Disease* 32, 412–419.

Eisele, Y.S., Obermüller, U., Heilbronner, G., Baumann, F., Kaeser, S.A., Wolburg, H., Walker, L.C., Staufenberg, M., Heikenwalder, M., und Jucker, M. (2010). Peripherally applied A β -containing inoculates induce cerebral β -amyloidosis. *Science* 330, 980–982.

Engert, F., und Bonhoeffer, T. (1999). Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* 399, 66–70.

Fein, J.A., Sokolow, S., Miller, C.A., Vinters, H. V, Yang, F., Cole, G.M., und Hoppens Gyls, K. (2008). Co-localization of amyloid beta and tau pathology in Alzheimer's disease synaptosomes. *The American Journal of Pathology* 172, 1683–1692.

Feng, G., Mellor, R.H., Bernstein, M., Keller-Peck, C., Nguyen, Q.T., Wallace, M., Nerbonne, J.M., Lichtman, J.W., und Sanes, J.R. (2000). Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* 28, 41–51.

Ferrer, I., Guionnet, N., Cruz-Sánchez, F., und Tuñón, T. (1990). Neuronal alterations in patients with dementia: a Golgi study on biopsy samples. *Neuroscience Letters* 114, 11–16.

Foster, N., Wilhelmsen, K., Sima, A., Jones, M., D'Amato, C., und Gilman, S. (1997). Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17: A consensus conference. *Annals of Neurology* 41, 706–715.

Frank, S., Clavaguera, F., und Tolnay, M. (2008). Tauopathy models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathologica* 115, 39–53.

Fu, M., und Zuo, Y. (2011). Experience-dependent structural plasticity in the cortex. *Trends in Neurosciences* 34, 177–187.

Fuhrmann, M., Bittner, T., Jung, C.K.E., Burgold, S., Page, R.M., Mitteregger, G., Haass, C., LaFerla, F.M., Kretschmar, H., und Herms, J. (2010). Microglial Cx3cr1 knockout prevents neuron loss in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience* 13, 411–413.

Garai, K., und Frieden, C. (2013). Quantitative analysis of the time course of A β oligomerization and subsequent growth steps using tetramethylrhodamine-labeled A β . *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 3321–3326.

Garcia-Alloza, M., Robbins, E.M., Zhang-Nunes, S.X., Purcell, S.M., Betensky, R.A., Raju, S., Prada, C., Greenberg, S.M., Bacskai, B.J., und Frosch, M.P. (2006). Characterization of amyloid deposition in the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiology of Disease* 24, 516–524.

Gasparini, L., Crowther, R.A., Martin, K.R., Berg, N., Coleman, M., Goedert, M., und Spillantini, M.G. (2011). Tau inclusions in retinal ganglion cells of human P301S tau transgenic mice: Effects on axonal viability. *Neurobiology of Aging* 32, 419–433.

Gatz, M., Reynolds, C.A., Fratiglioni, L., Johansson, B., Mortimer, J.A., Berg, S., Fiske, A., und Pedersen, N.L. (2006). Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Archives of General Psychiatry* 63, 168–174.

Gernhardt, R. (1997). *Lichte Gedichte*. Haffmans, Zürich.

Ghosh, M., Wu, M., Shafte, S.S., Kyrkanides, S., LaFerla, F.M., Olschowka, J.A., und O'Banion, M.K. (2013). Sustained interleukin-1 β overexpression exacerbates tau pathology despite reduced amyloid burden in an Alzheimer's mouse model. *The Journal of Neuroscience* 33, 5053–5064.

Gimbel, D.A., Nygaard, H.B., Coffey, E.E., Gunther, E.C., Laurén, J., Gimbel, Z.A., und Strittmatter, S.M. (2010). Memory impairment in transgenic Alzheimer mice requires cellular prion protein. *The Journal of Neuroscience* 30, 6367–6374.

Glenner, G., und Wong, C. (1984a). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 120, 885–890.

Glenner, G., und Wong, C. (1984b). Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 122, 1131–1135.

Goedert, M., und Jakes, R. (2005). Mutations causing neurodegenerative tauopathies. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1739, 240–250.

Goedert, M., Wischik, C.M., Crowther, R.A., Walker, J.E., und Klug, A. (1988). Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85, 4051–4055.

Goedert, M., Spillantini, M., Potier, M., Ulrich, J., und Crowther, R.A. (1989a). Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *The EMBO Journal* 8, 393–399.

Goedert, M., Spillantini, M., Jakes, R., Rutherford, D., und Crowther, R.A. (1989b). Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 3, 519–526.

Goedert, M., Spillantini, M.G., und Crowther, R.A. (1992a). Cloning of a big tau microtubule-associated protein characteristic of the peripheral nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89, 1983–1987.

Goedert, M., Spillantini, M., Cairns, N., und Crowther, R.A. (1992b). Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron* 8, 159–168.

Goedert, M., Ghetti, B., und Spillantini, M.G. (2011). Frontotemporal dementia: implications for understanding Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* doi: 10.1101/cshperspect.a006254.

Golde, T., Estus, S., und Younkin, L. (1992). Processing of the amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives. *Science* 255, 728–730.

Götz, J., und Ittner, L.M. (2008). Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nature Reviews Neuroscience* 9, 532–544.

- Götz, J., Chen, F., Van Dorpe, J., und Nitsch, R.M. (2001). Formation of neurofibrillary tangles in P301L tau transgenic mice induced by A β 42 fibrils. *Science* 293, 1491–1495.
- Götz, J., Eckert, A., Matamalas, M., Ittner, L., und Liu, X. (2012). Modes of A β toxicity in AD. *Cellular and Molecular Life Sciences* 68, 3359–3375.
- Grathwohl, S., Kälin, R., Bolmont, T., Prokop, S., Winkelmann, G., Kaeser, S., Odenthal, J., Radde, R., Eldh, T., Gandy, S., et al. (2009). Formation and maintenance of Alzheimer's disease beta-amyloid plaques in the absence of microglia. *Nature Neuroscience* 9, 1361–1363.
- Grillo, F.W., Song, S., Teles-Grilo Ruivo, L.M., Huang, L., Gao, G., Knott, G.W., Maco, B., Ferretti, V., Thompson, D., Little, G.E., et al. (2013). Increased axonal bouton dynamics in the aging mouse cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 1514–1523.
- Grutzendler, J., Kasthuri, N., und Gan, W.-B. (2002). Long-term dendritic spine stability in the adult cortex. *Nature* 420, 812–816.
- Grutzendler, J., Helmin, K., Tsai, J., und Gan, W.-B. (2007). Various dendritic abnormalities are associated with fibrillar amyloid deposits in Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1097, 30–39.
- Guerreiro, R., Lohmann, E., Brás, J., Gibbs, J., Rohrer, J., Gurunlian, N., Dursun, B., Bilgic, B., Hanagasi, H., Gurvit, H., et al. (2012). Using exome sequencing to reveal mutations in TREM2 presenting as a frontotemporal dementia-like syndrome without bone involvement. *JAMA Neurology* 70, 78–84.
- Guerreiro, R., Wojtas, A., Bras, J., Carrasquillo, M., Rogaeva, E., Majounie, E., Cruchaga, C., Sassi, C., Kauwe, J.S.K., Younkin, S., et al. (2013). TREM2 variants in Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine* 368, 117–127.
- Gurevicius, K., Lipponen, A., und Tanila, H. (2013). Increased Cortical and Thalamic Excitability in Freely Moving APPswe/PS1dE9 Mice Modeling Epileptic Activity Associated with Alzheimer's Disease. *Cerebral Cortex* 23, 1148–1158.
- Haass, C. (2010). Initiation and propagation of neurodegeneration. *Nature Medicine* 16, 1201–1204.
- Haass, C., Kaether, C., Thinakaran, G., und Sisodia, S. (2012). Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* doi: 10.1101/cshperspect.a006270.
- Hampton, D.W., Webber, D.J., Bilican, B., Goedert, M., Spillantini, M.G., und Chandran, S. (2010). Cell-mediated neuroprotection in a mouse model of human tauopathy. *The Journal of Neuroscience* 30, 9973–9983.
- Hanisch, U.-K., und Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature Neuroscience* 10, 1387–1394.
- Hardy, J., und Allsop, D. (1991). Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends in Pharmacological Sciences* 12, 383–388.

Hardy, J., und Selkoe, D.J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353–356.

Harris, K.M., Jensen, F.E., und Tsao, B. (1992). Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *The Journal of Neuroscience* 12, 2685–2705.

Harrison, J., Jiang, Y., Chen, S., Xia, Y., Maciejewski, D., McNamara, R., Streit, W., Salafranca, M., Adhikari, S., Thompson, D., et al. (1998). Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 10896–10901.

Hebb, D. (1949). *The organization of behavior: a neuropsychological theory*. New York, Wiley.

Hebron, M., Algarzae, N., Lonskaya, I., und Moussa, C. (2013). Fractalkine signaling and tau hyper-phosphorylation are associated with autophagic alterations in lentiviral tau and A β 1-42 gene transfer models. *Experimental Neurology* doi: 10.1016/j.expneurol.2013.01.009.

Helmchen, F., und Denk, W. (2005). Deep tissue two-photon microscopy. *Nature Methods* 2, 932–940.

Heneka, M.T., Kummer, M.P., Stutz, A., Delekate, A., Schwartz, S., Vieira-Saecker, A., Griep, A., Axt, D., Remus, A., Tzeng, T.-C., et al. (2013). NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature* 493, 674–678.

Higuchi, M., Lee, V.M.Y., und Trojanowski, J.Q. (2002). Tau and axonopathy in neurodegenerative disorders. *Neuromolecular Medicine* 2, 131–150.

Higuchi, M., Iwata, N., Matsuba, Y., Sato, K., Sasamoto, K., und Saido, T.C. (2005). 19F and 1H MRI detection of amyloid β plaques in vivo. *Nature Neuroscience* 8, 527–533.

Hildebrandt, H., Hoffmann, N.A., und Illing, R.-B. (2011). Synaptic reorganization in the adult rat's ventral cochlear nucleus following its total sensory deafferentation. *PLOS ONE* 6, e23686.

Ho, V.M., Lee, J.-A., und Martin, K.C. (2011). The cell biology of synaptic plasticity. *Science* 334, 623–628.

Holth, J., Bomben, V., Reed, J., Inoue, T., Younkin, L., Younkin, S., Pautler, R., Botas, J., und Noebels, J. (2013). Tau loss attenuates neuronal network hyperexcitability in mouse and drosophila genetic models of epilepsy. *The Journal of Neuroscience* 33, 1651–1659.

Holtmaat, A., und Svoboda, K. (2009). Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nature Reviews Neuroscience* 10, 647–658.

Holtmaat, A., Bonhoeffer, T., Chow, D.K., Chuckowree, J., De Paola, V., Hofer, S.B., Hübener, M., Keck, T., Knott, G., Lee, W.-C.A., et al. (2009). Long-term, high-resolution imaging in the mouse neocortex through a chronic cranial window. *Nature Protocols* 4, 1128–1144.

- Holtmaat, A.J.G.D., Trachtenberg, J.T., Wilbrecht, L., Shepherd, G.M., Zhang, X., Knott, G.W., und Svoboda, K. (2005). Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo. *Neuron* 45, 279–291.
- Hong, Y., Chan, C.B., Kwon, I.-S., Li, X., Song, M., Lee, H.-P., Liu, X., Sompol, P., Jin, P., Lee, H.-g., et al. (2012). SRPK2 phosphorylates tau and mediates the cognitive defects in Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience* 32, 17262–17272.
- Hoover, B.R., Reed, M.N., Su, J., Penrod, R.D., Kotilinek, L.A., Grant, M.K., Pitstick, R., Carlson, G. a, Lanier, L.M., Yuan, L.-L., et al. (2010). Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration. *Neuron* 68, 1067–1081.
- Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F., und Cole, G. (1996). Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274, 99–102.
- Hsieh, H., Boehm, J., Sato, C., Iwatsubo, T., Tomita, T., Sisodia, S., und Malinow, R. (2006). AMPA-R removal underlies A β -induced synaptic depression and dendritic spine loss. *52*, 831–843.
- Hutton, M., Lendon, C., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., Pickering-Brown, S., Chakraverty, S., Isaacs, A., Grover, A., et al. (1998). Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393, 702–705.
- Iba, M., Guo, J.L., McBride, J.D., Zhang, B., Trojanowski, J.Q., und Lee, V.M.-Y. (2013). Synthetic Tau Fibrils Mediate Transmission of Neurofibrillary Tangles in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's-Like Tauopathy. *The Journal of Neuroscience* 33, 1024–1037.
- Israel, M., Yuan, S., Bardy, C., und Reyna, S. (2012). Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature* 482, 216–220.
- Ittner, L.M., und Götz, J. (2011). Amyloid- β and tau - a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience* 12, 67–72.
- Ittner, L.M., Ke, Y.D., Delerue, F., Bi, M., Gladbach, A., Van Eersel, J., Wölfling, H., Chieng, B.C., Christie, M.J., und Napier, I.A. (2010). Dendritic function of tau mediates amyloid- β toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell* 142, 387–397.
- Jankowsky, J.L., Slunt, H.H., Ratovitski, T., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., und Borchelt, D.R. (2001). Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: a comparison of strategies. *Biomolecular Engineering* 17, 157–165.
- Jankowsky, J.L., Fadale, D.J., Anderson, J., Xu, G.M., Gonzales, V., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Lee, M.K., Younkin, L.H., Wagner, S.L., et al. (2004). Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. *Human Molecular Genetics* 13, 159–170.
- La Joie, R., Perrotin, A., Barre, L., Hommet, C., Mezenge, F., Ibazizene, M., Camus, V., Abbas, A., Landeau, B., Guilloteau, D., et al. (2012). Region-specific hierarchy between atrophy, hypometabolism, and β -amyloid (A β) load in Alzheimer's disease dementia. *The Journal of Neuroscience* 32, 16265–16273.

Jonsson, T., Atwal, J.K., Steinberg, S., Snaedal, J., Jonsson, P. V., Bjornsson, S., Stefansson, H., Sulem, P., Gudbjartsson, D., Maloney, J., et al. (2012). A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature* 488, 96–99.

Jonsson, T., Stefansson, H., Steinberg, S., Jonsdottir, I., Jonsson, P. V., Snaedal, J., Bjornsson, S., Huttenlocher, J., Levey, A.I., Lah, J.J., et al. (2013). Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine* 368, 107–116.

Jucker, M. (2010). The benefits and limitations of animal models for translational research in neurodegenerative diseases. *Nature Medicine* 16, 1210–1214.

Jung, C.K.E., und Herms, J. (2012). Role of APP for dendritic spine formation and stability. *Experimental Brain Research* 217, 463–470.

Jung, C.K.E., Fuhrmann, M., Honarnejad, K., Van Leuven, F., und Herms, J. (2011). Role of presenilin 1 in structural plasticity of cortical dendritic spines in vivo. *Journal of Neurochemistry* 119, 1064–1073.

Jung, S., Aliberti, J., Graemmel, P., Sunshine, M.J., Kreutzberg, G.W., Sher, A., und Littman, D.R. (2000). Analysis of Fractalkine Receptor CX3CR1 Function by Targeted Deletion and Green Fluorescent Protein Reporter Gene Insertion. *Molecular and Cellular Biology* 20, 4106–4114.

Kessels, H., Nabavi, S., und Malinow, R. (2013). Metabotropic NMDA receptor function is required for β -amyloid-induced synaptic depression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 4033–4038.

Kettenmann, H., Kirchhoff, F., und Verkhratsky, A. (2013). Microglia: new roles for the synaptic stripper. *Neuron* 77, 10–18.

Kim, T., Lim, H., Lee, J., Kim, D., Park, S., Lee, C., und Lee, C. (2008). Changes in the levels of plasma soluble fractalkine in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters* 436, 196–200.

Kitazawa, M., Oddo, S., Yamasaki, T., Green, K., und LaFerla, F. (2005). Lipopolysaccharide-induced inflammation exacerbates tau pathology by a cyclin-dependent kinase 5-mediated pathway in a transgenic model of Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience* 25, 8843–8853.

Klunk, W.E., Bacskai, B.J., Mathis, C.A., Kajdasz, S.T., McLellan, M.E., Frosch, M.P., Debnath, M.L., Holt, D.P., Wang, Y., und Hyman, B.T. (2002). Imaging A β plaques in living transgenic mice with multiphoton microscopy and methoxy-X04, a systemically administered Congo red derivative. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 61, 797–805.

Knoll, M., und Ruska, E. (1932). Das Elektronenmikroskop. *Zeitschrift für Physik* 78, 318–339.

Knott, G.W., Holtmaat, A., Wilbrecht, L., Welker, E., und Svoboda, K. (2006). Spine growth precedes synapse formation in the adult neocortex in vivo. *Nature Neuroscience* 9, 1117–1124.

- Kopeikina, K.J., Carlson, G. a, Pitstick, R., Ludvigson, A.E., Peters, A., Luebke, J.I., Koffie, R.M., Frosch, M.P., Hyman, B.T., und Spires-Jones, T.L. (2011). Tau accumulation causes mitochondrial distribution deficits in neurons in a mouse model of tauopathy and in human Alzheimer's disease brain. *The American Journal of Pathology* 179, 2071–2082.
- Kopeikina, K.J., Polydoro, M., Tai, H.-C., Yaeger, E., Carlson, G.A., Pitstick, R., Hyman, B.T., und Spires-Jones, T.L. (2013). Synaptic alterations in the rTg4510 mouse model of tauopathy. *The Journal of Comparative Neurology* 521, 1334–1353.
- Kraepelin, E. (1910). *Psychiatrie. Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte*. 8. Auflage, II. Band, Klinische Psychiatrie I. Teil, Barth Verlag, Leipzig.
- Kremer, A., Maurin, H., Demedts, D., Devijver, H., Borghgraef, P., und Van Leuven, F. (2011). Early improved and late defective cognition is reflected by dendritic spines in Tau.P301L mice. *The Journal of Neuroscience* 31, 18036–18047.
- Kremer, A., Borghgraef, P., Devijver, H., Duimel, H., Verheyen, F., und Van Leuven, F. (2012). Localization of protein tau: technical considerations. In *Acta Biomedica Lovaniensia* 561, Leuven University Press, 127–143.
- LaFerla, F., und Green, K. (2012). Animal models of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* doi: 10.1101/cshperspect.a006320.
- Larson, M., Sherman, M.A., Amar, F., Nuvolone, M., Schneider, J.A., Bennett, D.A., Aguzzi, A., und Lesné, S.E. (2012). The complex PrPc-fyn couples human oligomeric A β with pathological tau changes in Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience* 32, 16857–16871.
- Lasagna-Reeves, C.A., Castillo-Carranza, D.L., Sengupta, U., Guerrero-Munoz, M.J., Kiritoshi, T., Neugebauer, V., Jackson, G.R., und Kaye, R. (2012). Alzheimer brain-derived tau oligomers propagate pathology from endogenous tau. *Scientific Reports* 2, 700.
- Lee, C., und Landreth, G. (2010). The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. *Journal of Neural Transmission* 117, 949–960.
- Lee, G., Cowan, N., und Kirschner, M. (1988). The primary structure and heterogeneity of tau protein from mouse brain. *Science* 239, 285–288.
- Lee, S., Varvel, N.H., Konerth, M.E., Xu, G., Cardona, A.E., Ransohoff, R.M., und Lamb, B.T. (2010). CX3CR1 deficiency alters microglial activation and reduces beta-amyloid deposition in two Alzheimer's disease mouse models. *The American Journal of Pathology* 177, 2549–2562.
- Leroy, K., Bretteville, A., Schindowski, K., Gilissen, E., Authélet, M., De Decker, R., Yilmaz, Z., Buée, L., und Brion, J.-P. (2007). Early axonopathy preceding neurofibrillary tangles in mutant tau transgenic mice. *The American Journal of Pathology* 171, 976–992.
- Lewis, J., Dickson, D.W., Lin, W.L., Chisholm, L., Corral, A., Jones, G., Yen, S.H., Sahara, N., Skipper, L., Yager, D., et al. (2001). Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science* 293, 1487–1491.
- Li, N., Lee, B., Liu, R., und Banasr, M. (2010). mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science* 329, 959–964.

- Li, N., Liu, R., Dwyer, J.M., Banasr, M., Lee, B., Son, H., Li, X., Aghajanian, G., und Duman, R.S. (2011). Glutamate NMDA receptor antagonists rapidly reverse behavioral and synaptic deficits caused by chronic stress exposure. *Biological Psychiatry* 69, 754–761.
- Lin, M., und Beal, M. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443, 787–795.
- Lipinski, M.M., Zheng, B., Lu, T., Yan, Z., Py, B.F., Ng, A., Xavier, R.J., Li, C., Yankner, B. a, Scherzer, C.R., et al. (2010). Genome-wide analysis reveals mechanisms modulating autophagy in normal brain aging and in Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 14164–14169.
- Liu, R.-J., und Aghajanian, G.K. (2008). Stress blunts serotonin- and hypocretin-evoked EPSCs in prefrontal cortex: role of corticosterone-mediated apical dendritic atrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 359–364.
- Luk, K., Kehm, V., Carroll, J., Zhang, B., O'Brien, P., Trojanowski, J., und Lee, V.-Y. (2012). Pathological α -synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science* 338, 949–953.
- Mairet-Coello, G., Courchet, J., Pieraut, S., Courchet, V., Maximov, A., und Polleux, F. (2013). The CAMKK2-AMPK kinase pathway mediates the synaptotoxic effects of A β oligomers through tau phosphorylation. *Neuron* 78, 94–108.
- Mandelkow, E.-M., und Mandelkow, E. (2012). Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med* doi: 10.1101/cshperspect.a006247.
- Marker, D.F., Tremblay, M.-E., Lu, S.-M., Majewska, A.K., und Gelbard, H.A. (2010). A thin-skull window technique for chronic two-photon in vivo imaging of murine microglia in models of neuroinflammation. *Journal of Visualized Experiments* doi: 10.3791/2059.
- Martell, J.D., Deerinck, T.J., Sancak, Y., Poulos, T.L., Mootha, V.K., Sosinsky, G.E., Ellisman, M.H., und Ting, A.Y. (2012). Engineered ascorbate peroxidase as a genetically encoded reporter for electron microscopy. *Nature Biotechnology* 30, 1143–1148.
- Masliah, E., Mallory, M., Deerinck, T., DeTeresa, R., Lamont, S., Miller, A., Terry, R., Carragher, B., und Ellisman, M. (1993). Re-evaluation of the structural organization of neuritic plaques in Alzheimer's disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 52, 619–632.
- Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G., Nemoto, T., Miyashita, Y., Iino, M., und Kasai, H. (2001). Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nature Neuroscience* 4, 1086–1092.
- Maurer, K., Volk, S., und Gerbaldo, H. (1997). Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet* 349, 1546–1549.
- McGeer, P., McGeer, E., Rogers, J., und Sibley, J. (1990). Anti-inflammatory drugs and Alzheimer disease. *Lancet* 335, 1037.

- Merino-Serrais, P., Knafo, S., Alonso-Nanclares, L., Feraud-Espinosa, I., und DeFelipe, J. (2011). Layer-specific alterations to CA1 dendritic spines in a mouse model of Alzheimer's disease. *Hippocampus* 21, 1037–1044.
- Merino-Serrais, P., Benavides-Piccione, R., Blazquez-Llorca, L., Kastanauskaite, A., Rábano, A., Avila, J., und DeFelipe, J. (2013). The influence of phospho-tau on dendritic spines of cortical pyramidal neurons in Alzheimer's disease patients. *Brain* 136, 1913–1928.
- Meyer-Luehmann, M., Coomaraswamy, J., Bolmont, T., Kaeser, S., Schaefer, C., Kilger, E., Neuenschwander, A., Abramowski, D., Frey, P., Jaton, A., et al. (2006). Exogenous induction of cerebral beta-amyloidogenesis is governed by agent and host. *Science* 313, 1781–1784.
- Minkeviciene, R., Rheims, S., Dobszay, M.B., Zilberter, M., Hartikainen, J., Fülöp, L., Penke, B., Zilberter, Y., Harkany, T., Pitkänen, A., et al. (2009). Amyloid β -induced neuronal hyperexcitability triggers progressive epilepsy. *The Journal of Neuroscience* 29, 3453–3462.
- Minsky, M. (1961). Microscopy Apparatus. US Patent 3.013.467.
- Mirra, S., Heyman, A., McKeel, D., und Sumi, S. (1991). The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD) Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 41, 479–486.
- Mondragon-Rodriguez, S., Trillaud-Doppia, E., Dudilot, A., Bourgeois, C., Lauzon, M., Leclerc, N., und Boehm, J. (2012). Interaction of endogenous tau with synaptic proteins is regulated by NMDA-receptor dependent tau phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry* 287, 32040–32053.
- Morris, J., Aisen, P., Bateman, R., Benzinger, T., Cairns, N., Fagan, A., Ghetti, B., Goate, A., Holtzman, D., Klunk, W., et al. (2012). Developing an international network for Alzheimer research: The Dominantly Inherited Alzheimer Network. *Clinical Investigation* 2, 975–984.
- Morris, M., Maeda, S., Vossel, K., und Mucke, L. (2011). The many faces of tau. *Neuron* 70, 410–426.
- Mostany, R., Anstey, J.E., Crump, K.L., Maco, B., Knott, G., und Portera-Cailliau, C. (2013). Altered Synaptic Dynamics during Normal Brain Aging. *The Journal of Neuroscience* 33, 4094–4104.
- Müller, U., Winter, P., und Graeber, M. (2012). A presenilin 1 mutation in the first case of Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology* 12, 129–130.
- Nash, K.R., Lee, D.C., Hunt, J.B., Morganti, J.M., Selenica, M.-L., Moran, P., Reid, P., Brownlow, M., Guang-Yu Yang, C., Savalia, M., et al. (2013). Fractalkine overexpression suppresses tau pathology in a mouse model of tauopathy. *Neurobiology of Aging* 34, 1540–1548.
- Neve, R., Harris, P., Kosik, K., Kurnit, D., und Donlon, T. (1986). Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein. *Brain Research* 387, 271–280.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., und Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308, 1314–1318.

- Nixon, R. (2005). Endosome function and dysfunction in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Neurobiology of Aging* 26, 373–382.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kayed, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y., und Laferla, F.M. (2003a). Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron* 39, 409–421.
- Oddo, S., Caccamo, A., Kitazawa, M., Tseng, B.P., und Laferla, F.M. (2003b). Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 24, 1063–1070.
- Oddo, S., Billings, L., Kesslak, J.P., Cribbs, D.H., und LaFerla, F.M. (2004). A β immunotherapy leads to clearance of early, but not late, hyperphosphorylated tau aggregates via the proteasome. *Neuron* 43, 321–332.
- Oddo, S., Caccamo, A., Tran, L., Lambert, M.P., Glabe, C.G., Klein, W.L., und LaFerla, F.M. (2006). Temporal profile of amyloid- β (A β) oligomerization in an in vivo model of Alzheimer disease. A link between A β and tau pathology. *The Journal of Biological Chemistry* 281, 1599–1604.
- Oh, W.C., Hill, T.C., und Zito, K. (2013). Synapse-specific and size-dependent mechanisms of spine structural plasticity accompanying synaptic weakening. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 305–312.
- Okamoto, K.-I., Nagai, T., Miyawaki, A., und Hayashi, Y. (2004). Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nature Neuroscience* 7, 1104–1112.
- Ormö, M., Cubitt, a B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y., und Remington, S.J. (1996). Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* 273, 1392–1395.
- Park, J.H., Widi, G.A., Gimbel, D.A., Harel, N.Y., Lee, D.H.S., und Strittmatter, S.M. (2006). Subcutaneous nogo receptor removes brain amyloid- β and improves spatial memory in Alzheimer's transgenic mice. *The Journal of Neuroscience* 26, 13279–13286.
- Patterson, K.R., Remmers, C., Fu, Y., Brooker, S., Kanaan, N.M., Vana, L., Ward, S., Reyes, J.F., Philibert, K., Glucksman, M.J., et al. (2011). Characterization of prefibrillar tau oligomers in vitro and in Alzheimer disease. *The Journal of Biological Chemistry* 286, 23063–23076.
- Paula-Barbosa, M., Mota Cardoso, R., Guimaraes, M., und Cruz, C. (1980). Dendritic degeneration and regrowth in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Journal of the Neurological Sciences* 45, 129–134.
- Perucho, J., Rubio, I., Casarejos, M., Gomez, A., Rodriguez-Navarro, J., Solano, R., De Yébenes, J., und Mena, M. (2010). Anesthesia with isoflurane increases amyloid pathology in mice models of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 19, 1245–1257.
- Peters, A., und Kaiserman-Abramof, I. (1970). The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *American Journal of Anatomy* 127, 321–355.

- Phillips, M., Boman, E., Österman, H., Willhite, D., und Laska, M. (2011). Olfactory and visuospatial learning and memory performance in two strains of Alzheimer's Disease model mice - a longitudinal study. *PLOS ONE* 6, e19567.
- Pick, A. (1892). Über die Beziehungen der senilen Hirnatrophie zur Aphasie. *Prager Medicinische Wochenschrift* 17, 165–167.
- Pickering-Brown, S., Baker, M., Yen, S., Liu, W., Hasegawa, M., Cairns, N., Lantos, P., Rossor, M., Iwatsubo, T., Davies, Y., et al. (2000). Pick's disease is associated with mutations in the tau gene. *Annals of Neurology* 48, 859–867.
- Planel, E., Richter, K.E.G., Nolan, C.E., Finley, J.E., Liu, L., Wen, Y., Krishnamurthy, P., Herman, M., Wang, L., Schachter, J.B., et al. (2007). Anesthesia leads to tau hyperphosphorylation through inhibition of phosphatase activity by hypothermia. *The Journal of Neuroscience* 27, 3090–3097.
- Planel, E., Bretteville, A., Liu, L., Virag, L., Du, A.L., Yu, W.H., Dickson, D.W., Whittington, R.A., und Duff, K.E. (2009). Acceleration and persistence of neurofibrillary pathology in a mouse model of tauopathy following anesthesia. *The FASEB Journal* 23, 2595–2604.
- Plucinska, G., Paquet, D., Hruscha, A., Godinho, L., Haass, C., Schmid, B., und Misgeld, T. (2012). In vivo imaging of disease-related mitochondrial dynamics in a vertebrate model system. *The Journal of Neuroscience* 32, 16203–16212.
- Pooler, A.M., Phillips, E.C., Lau, D.H.W., Noble, W., und Hanger, D.P. (2013). Physiological release of endogenous tau is stimulated by neuronal activity. *EMBO Reports* 14, 389–394.
- Price, D., Martin, L., Sisodia, S., Wagster, M., Koo, E., Walker, L., Koliatsos, V., und Cork, L. (1991). Aged non-human primates: an animal model of age-associated neurodegenerative disease. *Brain Pathology* 1, 287–296.
- Prince, M., und Jackson, J. (2009). World Alzheimer Report 2009. Alzheimer's Disease International.
- Probst, A., Basler, V., Bron, B., und Ulrich, J. (1983). Neuritic plaques in senile dementia of Alzheimer type: a Golgi analysis in the hippocampal region. *Brain Research* 268, 249–254.
- Ramón y Cajal, S. (1888). Estructura de los centros nerviosos de las aves. *Rev. Trim. Histol. Norm. Pat.* 1, 1–10.
- Reiman, E., Langbaum, J., Fleisher, A., Caselli, R., Chen, K., Ayutyanont, N., Quiroz, Y., Kosik, K., Lopera, F., und Tariot, P. (2011). Alzheimer's Prevention Initiative: a plan to accelerate the evaluation of presymptomatic treatments. *Journal of Alzheimer's Disease* 26, 321–329.
- Roberson, E.D., Searce-Levie, K., Palop, J.J., Yan, F., Cheng, I.H., Wu, T., Gerstein, H., Yu, G.-Q., und Mucke, L. (2007). Reducing endogenous tau ameliorates amyloid β -induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science* 316, 750–754.
- Roberson, E.D., Halabisky, B., Yoo, J.W., Yao, J., Chin, J., Yan, F., Wu, T., Hamto, P., Devidze, N., Yu, G.-Q., et al. (2011). Amyloid- /Fyn-Induced Synaptic, Network, and Cognitive Impairments Depend on Tau Levels in Multiple Mouse Models of Alzheimer's Disease. *The Journal of Neuroscience* 31, 700–711.

Rochefort, N.L., und Konnerth, A. (2012). Dendritic spines: from structure to in vivo function. *EMBO Reports* 13, 699–708.

Rocher, A.B., Crimins, J.L., Amatrudo, J.M., Kinson, M.S., Todd-Brown, M.A., Lewis, J., und Luebke, J.I. (2010). Structural and functional changes in tau mutant mice neurons are not linked to the presence of NFTs. *Experimental Neurology* 223, 385–393.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., und Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487–491.

SantaCruz, K., Lewis, J., Spires, T., Paulson, J., Kotilinek, L., Ingelsson, M., Guimaraes, A., DeTure, M., Ramsden, M., McGowan, E., et al. (2005). Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* 309, 476–481.

Sato, K., Higuchi, M., Iwata, N., Saido, T.C., und Sasamoto, K. (2004). Fluoro-substituted and ¹³C-labeled styrylbenzene derivatives for detecting brain amyloid plaques. *European Journal of Medicinal Chemistry* 39, 573–578.

Scattoni, M.L., Gasparini, L., Alleva, E., Goedert, M., Calamandrei, G., und Spillantini, M.G. (2010). Early behavioural markers of disease in P301S tau transgenic mice. *Behavioural Brain Research* 208, 250–257.

Scheff, S., und Price, D. (2003). Synaptic pathology in Alzheimer's disease: a review of ultrastructural studies. *Neurobiology of Aging* 24, 1029–1046.

Schön, C., Hoffmann, N.A., Ochs, S.M., Burgold, S., Filser, S., Steinbach, S., Seeliger, M.W., Arzberger, T., Goedert, M., Kretschmar, H.A., et al. (2012). Long-term in vivo imaging of fibrillar tau in the retina of P301S transgenic mice. *PLOS ONE* 7, e53547.

Shahani, N., Subramaniam, S., Wolf, T., Tackenberg, C., und Brandt, R. (2006). Tau aggregation and progressive neuronal degeneration in the absence of changes in spine density and morphology after targeted expression of Alzheimer's disease-relevant tau constructs in organotypic hippocampal slices. *The Journal of Neuroscience* 26, 6103–6114.

Shankar, G.M., Bloodgood, B.L., Townsend, M., Walsh, D.M., Selkoe, D.J., und Sabatini, B.L. (2007). Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *The Journal of Neuroscience* 27, 2866–2875.

Shankar, G.M., Li, S., Mehta, T.H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N.E., Smith, I., Brett, F.M., Farrell, M.A., Rowan, M.J., Lemere, C.A., et al. (2008). Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nature Medicine* 14, 837–842.

Shu, X., Lev-Ram, V., Deerinck, T.J., Qi, Y., Ramko, E.B., Davidson, M.W., Jin, Y., Ellisman, M.H., und Tsien, R.Y. (2011). A genetically encoded tag for correlated light and electron microscopy of intact cells, tissues, and organisms. *PLoS Biology* 9, e1001041.

Skoch, J., Hickey, G., und Kajdasz, S. (2005). In vivo imaging of amyloid- β deposits in mouse brain with multiphoton microscopy. *Methods in Molecular Biology* 299, 349–363.

Snowdon, D. (1997). Aging and Alzheimer's disease: lessons from the Nun Study. *The Gerontologist* 37, 2950.

Sorra, K., und Harris, K. (2000). Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines. *Hippocampus* 10, 501–511.

Sperfeld, A., Collatz, M., Baier, H., Palmbach, M., Storch, A., Schwarz, J., Tatsch, K., Reske, S., Joosse, M., Heutink, P., et al. (1999). FTDP-17: An early onset phenotype with parkinsonism and epileptic seizures caused by a novel mutation. *Annals of Neurology* 46, 708–715.

Sperling, R., Karlawish, J., und Johnson, K. (2012). Preclinical Alzheimer disease - the challenges ahead. *Nature Reviews Neurology* 9, 54–58.

Spillantini, M., Murrell, J., Goedert, M., Farlow, M., Klug, A., und Ghetti, B. (1998). Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 7737–7741.

Spires, T., Meyer-Luehmann, M., Stern, E.A., McLean, P.J., Skoch, J., Nguyen, P.T., Bacskai, B.J., und Hyman, B.T. (2005). Dendritic spine abnormalities in amyloid precursor protein transgenic mice demonstrated by gene transfer and intravital multiphoton microscopy. *The Journal of Neuroscience* 25, 7278–7287.

Spires-Jones, T., und Knafo, S. (2012). Spines, plasticity, and cognition in Alzheimer's model mice. *Neural Plasticity*, doi: 10.1155/2012/319836.

Spires-Jones, T.L., Meyer-Luehmann, M., Osetek, J.D., Jones, P.B., Stern, E.A., Bacskai, B.J., und Hyman, B.T. (2007). Impaired spine stability underlies plaque-related spine loss in an Alzheimer's disease mouse model. *The American Journal of Pathology* 171, 1304–1311.

Spires-Jones, T.L., Stoothoff, W.H., De Calignon, A., Jones, P.B., und Hyman, B.T. (2009). Tau pathophysiology in neurodegeneration: A tangled issue. *Trends in Neurosciences* 32, 150–159.

Spittaels, K., Van den Haute, C., Van Dorpe, J., Bruynseels, K., Vandezande, K., Laenen, I., Geerts, H., Mercken, M., Sciot, R., Lommel, A. Van, et al. (1999). Prominent axonopathy in the brain and spinal cord of transgenic mice overexpressing four-repeat human tau protein. *American Journal of Pathology* 155, 2153–2165.

Stokin, G.B., Lillo, C., Falzone, T.L., Brusch, R.G., Rockenstein, E., Mount, S.L., Raman, R., Davies, P., Masliah, E., Williams, D.S., et al. (2005). Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Science* 307, 1282–1288.

Svoboda, K., und Yasuda, R. (2006). Principles of two-photon excitation microscopy and its applications to neuroscience. *Neuron* 50, 823–839.

Tackenberg, C., Ghori, A., und Brandt, R. (2009). Thin, Stubby or Mushroom: Spine Pathology in Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research* 6, 261–268.

Takahashi, R.H., Capetillo-Zarate, E., Lin, M.T., Milner, T.A., und Gouras, G.K. (2010). Co-occurrence of Alzheimer's disease β -amyloid and tau pathologies at synapses. *Neurobiology of Aging* 31, 1145–1152.

- Tanzi, R.E. (2012). The genetics of Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* doi: 10.1101/cshperspect.a006296.
- Terry, R. (1996). The pathogenesis of Alzheimer disease: an alternative to the amyloid hypothesis. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 55, 1023–1025.
- Testa, I., Urban, N.T., Jakobs, S., Eggeling, C., Willig, K.I., und Hell, S.W. (2012). Nanoscopy of living brain slices with low light levels. *Neuron* 75, 992–1000.
- Thal, D.R., und Braak, H. (2005). Postmortale Diagnosestellung bei Morbus Alzheimer. *Der Pathologe* 26, 201–213.
- Thal, D., Rüb, U., Orantes, M., und Braak, H. (2002). Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology* 58, 1791–1800.
- Trachtenberg, J.T., Chen, B.E., Knott, G.W., Feng, G., Sanes, J.R., Welker, E., und Svoboda, K. (2002). Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature* 420, 788–794.
- Uchihara, T. (2007). Silver diagnosis in neuropathology: principles, practice and revised interpretation. *Acta Neuropathologica* 113, 483–499.
- Ullian, E., Christopherson, K., und Barres, B. (2004). Role for glia in synaptogenesis. *Glia* 47, 209–216.
- UNFPA und HelpAge International (2012). Ageing in the twenty-first century - A celebration and a challenge. ISBN: 978-0-89714-981-5.
- Velasco, A., Fraser, G., Delobel, P., Ghetti, B., Lavenir, I., und Goedert, M. (2008). Detection of filamentous tau inclusions by the fluorescent Congo red derivative FSB [(trans,trans)-1-fluoro-2,5-bis(3-hydroxycarbonyl-4-hydroxy)styrylbenzene]. *FEBS Letters* 582, 901–906.
- Vidal, M., Morris, R., Grosveld, F., und Spanopoulou, E. (1990). Tissue-specific control elements of the Thy-1 gene. *The EMBO Journal* 9, 833–840.
- Wake, H., Moorhouse, A., Jinno, S., Kohsaka, S., und Nabekura, J. (2009). Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *The Journal of Neuroscience* 29, 3974–3980.
- Wake, H., Moorhouse, A.J., Miyamoto, A., und Nabekura, J. (2013). Microglia: actively surveying and shaping neuronal circuit structure and function. *Trends in Neurosciences* 36, 209–217.
- Ward, S.M., Himmelstein, D.S., Lancia, J.K., und Binder, L.I. (2012). Tau oligomers and tau toxicity in neurodegenerative disease. *Biochemical Society Transactions* 40, 667–671.
- Wegmann, S., Medalsya, I.D., Mandelkow, E., und Müller, D.J. (2013). The fuzzy coat of pathological human Tau fibrils is a two-layered polyelectrolyte brush. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 313–321.
- Wei, W., Nguyen, L.N., Kessels, H.W., Hagiwara, H., Sisodia, S., und Malinow, R. (2010). Amyloid beta from axons and dendrites reduces local spine number and plasticity. *Nature Neuroscience* 13, 190–196.

- Weingarten, M., Lockwood, A., Hwo, S.-Y., und Kirschner, M. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 72, 1858–1862.
- Weintraub, S., Wicklund, A.H., und Salmon, D.P. (2012). The neuropsychological profile of Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* doi: 10.1101/cshperspect.a006171.
- Wirths, O., Multhaup, G., und Bayer, T. (2004). A modified beta-amyloid hypothesis: intraneuronal accumulation of the beta-amyloid peptide - the first step of a fatal cascade. *Journal of Neurochemistry* 91, 513–520.
- Wirths, O., Weis, J., Szczygielski, J., Multhaup, G., und Bayer, T.A. (2006). Axonopathy in an APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica* 111, 312–319.
- Wong, E., und Cuervo, A.M. (2010). Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases. *Nature Neuroscience* 13, 805–811.
- Wyss-Coray, T., und Rogers, J. (2012). Inflammation in Alzheimer disease-a brief review of the basic science and clinical literature. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* doi: 10.1101/cshperspect.a006346.
- Xu, H.-T., Pan, F., Yang, G., und Gan, W.-B. (2007). Choice of cranial window type for in vivo imaging affects dendritic spine turnover in the cortex. *Nature Neuroscience* 10, 549–551.
- Yamanaka, M., Ishikawa, T., Griep, A., Axt, D., Kummer, M.P., und Heneka, M.T. (2012). PPAR γ /RXR α -induced and CD36-mediated microglial amyloid- β phagocytosis results in cognitive improvement in amyloid precursor protein/presenilin 1 mice. *The Journal of Neuroscience* 32, 17321–17331.
- Yang, G., Pan, F., Parkhurst, C.N., Grutzendler, J., und Gan, W.-B. (2010). Thinned-skull cranial window technique for long-term imaging of the cortex in live mice. *Nature Protocols* 5, 201–208.
- Yoshiyama, Y., Higuchi, M., Zhang, B., Huang, S.-M., Iwata, N., Saido, T.C., Maeda, J., Suhara, T., Trojanowski, J.Q., und Lee, V.M.-Y. (2007). Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron* 53, 337–351.
- Yuste, R. (2011). Dendritic spines and distributed circuits. *Neuron* 71, 772–781.
- Zahs, K.R., und Ashe, K.H. (2010). "Too much good news" - are Alzheimer mouse models trying to tell us how to prevent, not cure, Alzheimer's disease? *Trends in Neurosciences* 33, 381–389.
- Zempel, H., Thies, E., Mandelkow, E., und Mandelkow, E.-M. (2010). A Oligomers Cause Localized Ca²⁺ Elevation, Missorting of Endogenous Tau into Dendrites, Tau Phosphorylation, and Destruction of Microtubules and Spines. *The Journal of Neuroscience* 30, 11938–11950.

6. ANHANG

6.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
Aβ	Amyloid-β-Peptid
Aβ _{40/42}	Amyloid-β-Peptid von 40 bzw. 42 Aminosäuren Länge
ABC	engl.: avidin-biotin-complex (Avidin-Biotin-Komplex)
AD	Alzheimer-Demenz; Alzheimer's disease
AMPA	engl.: α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
ANOVA	engl.: analysis of variance (Varianzanalyse)
APP	engl.: amyloid precursor protein (amyloid Vorläuferprotein)
Blr1	Burkitt-Lymphom-Rezeptor 1
bp	Basenpaare
BP	Bandpass
BSA	Bovines Serum Albumin
cm	Zentimeter (10^{-2} m)
CWFS	engl.: cold water fish skin (Kaltwasserfisch-Haut)
CX ₃ CR1	engl.: (C-X3-C motif) receptor 1
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EGFP	engl.: enhanced green fluorescent protein (verstärktes grün fluoreszierendes Protein)
EM	Elektronenmikroskop
engl.	englisch
et al.	lat.: et alii / aliae (und andere)
FAD	Familiäre Alzheimer-Demenz
fr.	französisch
FTDP-17	Frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus gekoppelt mit Chromosom 17
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
gr.	griechisch
h	Stunde
HRP	engl.: horse raddish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
i.p.	intraperitoneal
IVC	engl.: individually ventilated cage (individuell ventilierter Käfig)
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm (10^3 g)
KGW	Körpergewicht
KP	Kurzpass

I	Liter
lat.	lateinisch
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LSM	Laserscanningmikroskop(ie)
LTD	engl.: long-term depression (Langzeit-Depression)
LTP	engl.: long-term potentiation (Langzeit-Potenzierung)
m	Meter
MAPT	Mikrotubuli assoziiertes Protein Tau
µg	Mikrogramm (10^{-6} g)
µl	Mikroliter (10^{-6} l)
µm	Mikrometer (10^{-6} m)
µM	Mikromolar (10^{-6} M)
mg	Milligramm (10^{-3} g)
ml	Milliliter (10^{-3} l)
mm	Millimeter (10^{-3} m)
mM	Millimolar (10^{-3} M)
ms	Millisekunde (10^{-3} s)
mW	Milliwatt (10^{-3} W)
min	Minute
NA	Numerische Apertur
NDD	engl.: non-descanned detector
NF-L	Neurofilament, leichte Untereinheit
NFT	engl.: neurofibrillary tangle (neurofibrillärer Tangle)
nm	Nanometer (10^{-9} m)
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PBS	engl.: phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	engl.: polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
PMT	engl.: photomultiplier tube (Fotoelektronenvervielfacher)
PS1, <i>PSEN1</i>	Präsenilin 1
PSD	Postsynaptische Dichte
q-PCR	quantitative Echtzeit-PCR
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SA	Standardabweichung
SAM	Standardfehler des arithmetischen Mittels
s.c.	subkutan
SPF	spezifiziert pathogenfrei
Tab.	Tabelle
Tcra	T-Zell-Rezeptor Untereinheit alpha
TEM	Transmissionselektronenmikroskop(ie)
Tm	engl.: melting temperature (Schmelztemperatur)
TSA	Tyramid-Signal-Amplifizierung
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
vs.	lat.: versus (gegen, im Vergleich zu)
WT	Wildtyp
YFP	engl.: yellow fluorescent protein (gelb fluoreszierendes Protein)
ZNS	Zentralnervensystem

6.2 Abbildungsverzeichnis

Deckblatt: Thioflavin-S Färbung eines AD-Gehirnpräparats	
Abb. 1: Humane Tau-Isoformen und FTDP-17 Mutationen	7
Abb. 2: Hyperphosphorylierung und Aggregation des Tau-Proteins.....	8
Abb. 3: Die Krankheit des Vergessens	10
Abb. 4: APP-Prozessierung und A β -Aggregation	13
Abb. 5: Amyloid-Kaskaden-Hypothese der Alzheimer-Demenz	14
Abb. 6: Signalübertragung mittels exzitatorischer Synapsen.....	20
Abb. 7: Morphologie dendritischer Spines	21
Abb. 8: Prinzipien der Ein- und Zwei-Photonen Mikroskopie	26
Abb. 9: Agarosegele zur Genotypisierung transgener Mäuse	37
Abb. 10: Einbau des chronischen kraniellen Fensters	40
Abb. 11: Intravitalmikroskopie	43
Abb. 12: Regionenauswahl zur Synapsendichte-Analyse	50
Abb. 13: Zweidimensionale Analyse der Plaque- und Dystrophien-Fläche	52
Abb. 14: Histologische Läsionen und Motorphänotyp homozygoter Tau P301S-Mäuse.....	60
Abb. 15: Spine-Dichte und -Kinetik in Wildtyp- und Tau-Mäusen	62
Abb. 16: Spine-Morphologie in Wildtyp- und Tau-Mäusen	63
Abb. 17: (Phospho-)Tau in YFP-exprimierenden Neuronen	65
Abb. 18: Kein Phospho-Tau in kortikalen dendritischen Spines	67
Abb. 19: Zeitserie axonaler Boutons	68
Abb. 20: Synapsendichten in Kortex und Hippocampus: PSD-95 und Synapsin1/2	71
Abb. 21: Evaluierung der PSD-95-, Synapsin1/2- und Synaptophysin-Färbungen	71
Abb. 22: Präsynapsendichten im visuellen und entorhinalen Kortex: Synaptophysin	72
Abb. 23: Intravitalmikroskopie neuronaler Somata	73
Abb. 24: Kortikale Tau-Pathologie in Abhängigkeit der Fraktalkinrezeptor-Expression	76
Abb. 25: AD-typische Läsionen in Tau-, APP PS1- und Tau x APP PS1-Mäusen	78
Abb. 26: Plaques und assoziierte Dystrophien in APP PS1- und Tau x APP PS1-Mäusen	81
Abb. 27: Zeitserien dendritischer Spines in Wildtyp-, Tau- und Tau x APP PS1-Mäusen.....	82
Abb. 28: Spine-Dichten und -Kinetik in Wildtyp-, Tau- und Tau x APP PS1-Mäusen.....	85
Abb. 29: Spine-Dichten und Plaque-Entfernung in Tau x APP PS1-Mäusen	85
Abb. 30: Spine-Morphologie in Wildtyp-, Tau- und Tau x APP PS1-Mäusen	86
Abb. 31: A β - und Tau-Pathologie im Hippocampus alter 3xTg-AD x YFP-Mäuse.....	88
Abb. 32: Neuritische Dystrophien im Kortex alter 3xTg-AD x YFP-Mäuse	89

6.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Erkrankungen mit neuronaler Tau-Pathologie (nach Spires-Jones et al., 2009)	6
Tab. 2: (q-)PCR-Primer und -Sonden	35
Tab. 3: (q-)PCR-Ansätze und -Programme	36
Tab. 4: Materialien zur Maus-Genotypisierung.....	38
Tab. 5: Pufferlösung zur Maus-Genotypisierung	38
Tab. 6: Materialien zur Fensterimplantation und Intravitalmikroskopie	44
Tab. 7: Protokoll Tyramid-Alexa Fluor 647 Einzelfärbung (AT8, AT180, HT7, NF-L)	48
Tab. 8: Protokoll Alexa Fluor 647 Einzelfärbung (AT100, PSD-95, Synapsin1/2, Synaptophysin).....	49
Tab. 9: Protokoll DAB-Einzelfärbung (AT8).....	53
Tab. 10: Protokoll DAB- (GFP) und Immunogold- (AT8, 6E10) Doppelfärbung.....	54
Tab. 11: Chemikalien zur Immunhistochemie	56
Tab. 12: Antikörper, Seren und Kits zur Immunhistochemie	57
Tab. 13: Pufferlösungen zur Immunhistochemie	57
Tab. 14: YFP-exprimierende Schicht II/III Neuronen.....	73

7. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jochen Herms für die Unterstützung dieses Projekts, seine vertrauensvolle Betreuung inklusive kritischer Diskussionen und stete wissenschaftliche und persönliche Förderung durch die Ermöglichung von Kurs- und Kongressteilnahmen.

Vielen Dank möchte ich Frau Prof. Dr. Dr. Elisabeth Weiß aussprechen für ihr Interesse an meiner Arbeit und ihre Bereitschaft, diese extern zu betreuen.

Herrn Prof Dr. Uhl danke ich für seine Zeit und Mühe bei der Erstellung des Zweitgutachtens.

Außerdem danke ich allen Mitarbeitern des Zentrums für Neuropathologie und Prionforschung, insbesondere der expandierenden Arbeitsgruppe Herms, für ein außergewöhnlich gutes Arbeitsklima. Ein spezielles Danke geht an Steffen Burgold und Dr. Mario Dorostkar für ihre methodischen Hilfeleistungen, Chengyu Zou, Alexandra Tregubova und Eric Gießinger für ihre Mitarbeit bei der Daten-Analyse, Severin Filser für fundierte wissenschaftliche Euphorie, Sonja Steinbach und Patrizia Bonert für ihren unermüdlichen Einsatz rund um die Tierzucht, Michael Schmidt für technische Unterstützung und David Brucker für auffrischende Mittagspausen.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern für ihre zuverlässige, bedingungslose Unterstützung in allen Lebenslagen und ihr großes Interesse an diesem Projekt.

Mein größter Dank gilt Christian Kaulfuß.

8. LEBENSLAUF

Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Fassung entfernt.

9. EIGENE PUBLIKATIONEN

Hoffmann, N. A., Zou, C., und Herms, J. (2013). Synergistic pathological effects of tau and A β on dendritic spines.

Manuskript in Vorbereitung.

Hoffmann, N. A., Dorostkar, M. M., Blumenstock, S., Goedert, M., und Herms, J. (2013). Impaired plasticity of cortical dendritic spines in P301S tau transgenic mice. *Acta Neuropathologica Communications*. 1(1):82

Schön, C., **Hoffmann, N. A.**, Ochs, S. M., Burgold, S., Filser, S., Steinbach, S., Seeliger, M. W., Arzberger, T., Goedert, M., Kretzschmar, H. A., Schmidt, B., und Herms, J. (2012). Long-term in vivo imaging of fibrillar tau in the retina of P301S transgenic mice. *PLOS ONE*. 7(12):e53547.

Hildebrandt, H., **Hoffmann, N. A.**, und Illing, R. B. (2011). Synaptic reorganization in the adult rat's ventral cochlear nucleus following its total sensory deafferentation. *PLOS ONE*. 6(8):e23686.

Bittner, T., Fuhrmann, M., Burgold, S., Ochs, S. M., **Hoffmann, N. A.**, Mitteregger, G., Kretzschmar, H. A., LaFerla, F. M., und Herms, J. (2010). Multiple events lead to dendritic spine loss in triple transgenic Alzheimer's disease mice. *PLOS ONE*. 5(11):e15477.